



# Rôles et modes d'action de l'annexine A1 dans la dissémination du mélanome cutané

Zied Boudhraa

## ► To cite this version:

Zied Boudhraa. Rôles et modes d'action de l'annexine A1 dans la dissémination du mélanome cutané. Biologie moléculaire. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2013. Français. NNT : 2013CLF1PP08 . tel-01165204

**HAL Id: tel-01165204**

**<https://theses.hal.science/tel-01165204>**

Submitted on 18 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

*Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne  
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)  
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Soutenue le 16 décembre 2013

**Zied BOUDHRAA**

---

**Rôles et modes d'action de l'annexine A1 dans la  
dissémination du mélanome cutané**

---

Président : Pr. Michel D'Incan

Rapporteurs : Dr Odile Berthier-Vergnes  
Pr Michel Seve  
Dr Jean-Claude Monboisse

Examineur : Dr Christine Merle

Directeur de thèse : Dr Françoise Degoul

Co-Directeur de Thèse : Pr Bernadette Bouchon

UMR 990 INSERM/UdA  
Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée  
58 Rue Montalembert, 63005 Clermont-Ferrand cedex



## **Remerciements**

*Il me reste une dernière page à écrire très importante à mes yeux et par laquelle je souhaite remercier tous mes amis, mes collègues de travail ainsi que toutes les personnes qui m'ont entouré et soutenu et qui ont fait que ces trois années de thèse resteront un excellent souvenir.*

*Je remercie :*

*L'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Le Professeur Jean-Michel Chezal de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour réaliser cette thèse. Merci pour ton soutien et tes encouragements.*

*L'ensemble des personnes ayant fait partie de mon jury de thèse :*

*Le Docteur Françoise Degoul, ma directrice. Merci de m'avoir fait confiance dans mon travail, merci pour tous tes conseils, tes idées, tes encouragements. Je ne regrette qu'une chose : que tu n'aies pas pu venir voir les Zed Is Dead en live...*

*Le Professeur Bernadette Bouchon, ma co-directrice qui m'a tellement appris (des astuces en spectrométrie de masse, des protocoles en protéomique très efficaces, à avoir l'esprit analytique, le Français, l'Anglais ©.....). Ta bonne humeur et ta joie de vivre vont vraiment me manquer.*

*Bernadette, surtout ne change pas, reste comme tu es !!!!!!!*

*Je voudrais également remercier toutes les personnes ayant collaborées à différents moments de ma thèse qu'elles fassent partie de l'unité ou d'un autre laboratoire.*

*Christine Merle, gérante de protéodynamics, sans toi je n'aurais pas pu profiter de la bourse « innovation ». Merci pour tes conseils techniques et scientifiques et tes encouragements.*

*M. Christophe Chambon et Le docteur Damien Richard pour les analyses de spectrométrie de masse*

*M. Dominique Mazzocut pour les séquençages d'Edman*

*Je tiens aussi à remercier Elisabeth Billard et Mathilde Bonnet de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner.*

*Une personne que je tiens à remercier particulièrement : Claire Viallard, tu as été ma collègue de bureau ☺. Merci pour ta joie de vivre, ta motivation et surtout pour ton aide au labo. Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse.*



*Merci à tout le personnel de l'UMR 990 Inserm/Uda, les personnes encore présentes dans l'unité comme les personnes qui ne sont plus là mais qui ont croisé ma route et qui m'ont parfois aidé ou conseillé. Je ne peux pas citer tous les noms mais chacun se reconnaitra. Un petit clin d'œil, cependant, à notre super ex-secrétaire Jacqueline. Il faut également que je souhaite bon courage à tous les thésards qui me suivront, Claire et Aurélien.*

*Mes remerciements vont également à l'ensemble de ma famille, ma sœur Mona et Mehdi, mon frère, ainsi qu'à mes parents qui m'ont toujours soutenu et que j'adore. Je sais vraiment que j'ai de la chance d'appartenir à une famille comme la mienne.*

*Je remercie aussi tous mes amis dont la liste serait trop longue à énumérer. Parmi eux, j'aimerais plus particulièrement remercier Blaise, Noellie, Sophie, Camille et Léo. Mais aussi mes amis de la musique, les Zed Is Dead et les dirty old wolves. Heureusement que vous êtes là !!!!*

*Aussi Rihab, je te serai toujours redevable des nuits passées à m'aider sur la mise en forme de ce manuscrit, merci ma grande !!!!!!!*

***Merci à tous !!!!***



## Sommaire

RÉSUMÉ.....	4
ABSTRACT .....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	6
LISTE DES FIGURES .....	10
LISTE DES TABLEAUX .....	13

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>14</b>
---------------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>16</b>
----------------------------	-----------

LA PEAU .....	17
I- L'épiderme .....	17
II- La jonction dermo-épidermique .....	18
III- Le derme .....	18
IV- L'hypoderme .....	19
LES MÉLANOCYTES .....	20
I- Origine et différenciation .....	20
II- Mélanosomes .....	20
III- Mélanine et mélanogenèse .....	21
IV- Unité épidermique de mélanisation .....	21
LE MÉLANOME CUTANÉ .....	24
I- Epidémiologie .....	24
II- Classification anatomo-clinique .....	25
III- Critères du pronostic .....	26
IV- Classification internationale .....	26
DU MÉLANOCYTE AU MÉLANOME .....	27
I- Protéines associées à la voie MAPK .....	28
1) NRAS .....	28
2) BRAF .....	28
II- Protéines associées à la voie PI3K/ PTEN .....	29
III- Protéines associées à la voie $\beta$ -caténine .....	30
IV- Protéines régulant le cycle cellulaire (INK4A/ARF) .....	30
1) La voie p16 <sup>INK4A</sup> -CDK4/6-Rb .....	31
2) La voie ARF-p53 .....	31
V- Les facteurs de transcription .....	32
1) AP-2 et CREB .....	32
2) ATF2 .....	33
3) Snail .....	33
4) NF $\kappa$ B .....	34
5) Les STATs .....	34
6) MITF .....	35





<i>VI- Les molécules d'adhésion.....</i>	<i>36</i>
1) Les cadhérines .....	37
2) Les intégrines .....	38
a) L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ .....	38
b) L'intégrine $\alpha V\beta 3$ .....	39
c) L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ .....	39
3) Les immunoglobulines .....	40
a) MCAM/MUC18 .....	40
b) ICAM-1 .....	40
<i>VII- Les protéases .....</i>	<i>41</i>
<i>VIII- Les récepteurs membranaires.....</i>	<i>43</i>
1) Récepteurs à activité tyrosine kinase.....	44
a) EGFR.....	44
b) Kit.....	44
c) C-MET.....	45
2) Récepteurs couplés aux protéines G.....	45
a) PAR1 .....	45
b) Les FPRs.....	46
TRAITEMENT DU MÉLANOME .....	47
I- La chimiothérapie .....	47
II- L'immunothérapie .....	48
1) Anticorps anti CTLA-4.....	49
2) Anticorps anti PD-1 et PD-L1 .....	50
III- Thérapies ciblées.....	50
1) Inhibiteurs de BRAF.....	50
2) Inhibiteurs de MEK.....	51
3) Inhibiteurs de c-Kit.....	52
IV- Traitement par association de deux médicaments .....	53
LES ANNEXINES .....	54
I- Structure de l'annexine A1 .....	54
1) Le cœur protéique.....	55
2) Le motif N-terminal.....	55
II- ANXA1 et le contrôle de la réponse inflammatoire.....	56
1) les partenaires d'ANXA1 dans l'inflammation .....	57
2) Externalisation d'ANXA1 .....	58
3) Le clivage d'ANXA1 .....	58
III- Fonctions d'ANXA1.....	59
1) L'agrégation membranaire .....	59
2) L'endocytose .....	60
3) L'exocytose .....	60
4) La prolifération.....	61
5) L'apoptose.....	61
6) La migration .....	62
IV- Dérégulation des annexines dans les cancers.....	62
1) Les annexines .....	62
2) ANXA1 .....	63
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>66</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>68</b>
I- Tumeurs humaines.....	69
II- Culture cellulaire et traitements .....	69
1) Culture cellulaire .....	69
2) Traitements par des inhibiteurs de protéases .....	69



III- Préparation des protéines .....	70
1) Protéines cellulaires.....	70
2) Protéines des surnageants .....	70
3) Protéines associées aux membranes externes de façon calcium dépendante.....	70
4) Fractionnement subcellulaire.....	70
5) Enrichissement en annexines.....	71
IV- Electrophorèse bidimensionnelle .....	72
V- Identification des protéines par spectrométrie de masse .....	72
1) Fractions enrichies en annexines .....	72
2) Protéines membranaire des cellules A375.....	73
VI- Séquençage N- terminal d'ANXA1 clivée par dégradation d'Edman.....	74
VII- Western blot.....	74
VIII- Digestion d'ANXA1 recombinante .....	74
1) Par la fraction membranaire et le milieu conditionné des cellules A375 .....	74
2) Après séparation des protéines membranaires par SDS/PAGE.....	75
<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>76</b>
PARTIE I: IMPLICATION DE L'ANNEXINE A1 DANS L'INVASION DU MÉLANOME CUTANÉ..	78
I- Introduction.....	78
II- ANXA1 in prymary promotes melanoma dissemination .....	79
III- Conclusions .....	99
PARTIE II : EXPRESSION DES ANNEXINES ET CARACTÉRISATION DU CLIVAGE DE	
L'ANNEXINE A1 DANS LE MÉLANOME .....	101
I- Introduction.....	101
II- Résultats et discussion.....	102
1) Enrichissement en annexines de xénogreffes de mélanome humain.....	102
2) Caractérisation du clivage d'ANXA1.....	104
a) Association entre ANXA1 clivée et invasion.....	104
b) Détermination du site de clivage d'ANXA1 .....	104
c) Détermination de la classe de protéases responsable du clivage d'ANXA1 .....	105
d) Localisation subcellulaire du clivage d'ANXA1.....	105
e) Localisation de la protéase responsable du clivage d'ANXA1 .....	106
f) Identification de la protéase responsable du clivage d'ANXA1.....	107
III- Conclusions.....	107
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES .....</b>	<b>109</b>
I- Rôle d'ANXA1 dans la dissémination du mélanome cutané .....	111
1) Etudes in vivo .....	111
2) Etudes in vitro .....	112
II- Mode d'action d'ANXA1 .....	114
1) Externalisation d'ANXA1 .....	114
2) Interaction d'ANXA1 endogène avec les FPRs .....	115
III- Conclusions .....	116
<b>ANNEXES.....</b>	<b>118</b>
<b>REFERNES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>125</b>



## **Résumé**

Le mélanome cutané est le plus agressif des cancers de la peau. Une fois métastasé, les options thérapeutiques sont limitées et peu efficaces. Dans le but de trouver de nouveaux marqueurs d'agressivité du mélanome cutané, une étude protéomique comparative entre deux lignées de mélanome murin, génétiquement semblables mais avec des agressivités différentes, a permis d'identifier l'annexine A1 (ANXA1) comme une protéine pro-invasive. Le but de ce travail de thèse a été d'évaluer la valeur pronostique d'ANXA1 et de déterminer son rôle et son mode d'action dans les processus d'invasion des mélanomes humains. Lors d'une étude immunohistologique rétrospective sur deux centres (Clermont-Ferrand et Saint-Etienne), il a été observé, indépendamment de l'indice de Breslow, une corrélation inverse entre le taux d'ANXA1 dans les tumeurs primitives de 61 patients et le délai d'apparition des métastases. Cette association est due à l'implication d'ANXA1 dans les processus d'invasion. En effet, nous avons démontré dans différentes lignées de mélanome qu'ANXA1 extracellulaire stimule les récepteurs aux peptides formylés (FPRs) exprimés par ces cellules. Cette fixation aux FPRs induit les voies des MAPK et STAT3 qui entraînent l'activation des métalloprotéases (MMP2). L'induction des MMP2 par ANXA1 augmente significativement le pouvoir invasif des lignées de mélanome. Nous avons aussi démontré qu'ANXA1 est transloquée coté externe de la membrane cytoplasmique là où elle subit un clivage par une sérine protéase qui pourrait être la nicaline. Ce clivage qui se produit après la sérine 28 n'a pas été décrit et jouerait un rôle dans la capacité invasive des mélanomes en libérant un ou des peptide(s) proinvasif(s). A long terme, ce travail vise à utiliser ANXA1 comme marqueur pronostique et/ou cible thérapeutique du mélanome cutané.

**Mots clés:** mélanome, dissémination, ANXA1, FPRs, protéomique, clivage



## **Abstract**

Cutaneous melanoma is the most aggressive skin cancer. Treatment options are limited and inefficient when melanoma has metastasized. In order to identify new markers of melanoma dissemination, protein profiles of two genetically similar murine melanoma cell lines have been compared. Both B16F10 and B16Bl6 cells induced primary tumours after subcutaneous graft, however, only B16Bl6 melanomas develop metastases. Among proteins differentially expressed, annexin A1 (ANXA1) is overexpressed in the aggressive B16Bl6 melanoma. The aim of the present work was to assess ANXA1 prognostic value in human melanoma and to decipher its implication in the invasion process. We report that, regardless of Breslow index, ANXA1 expression in primary tumours of 61 patients is inversely correlated with time to metastasis. This correlation is due to ANXA1 involvement in the invasion processes. Indeed, we show that in different human melanoma cell lines, extra cellular ANXA1 stimulates Formylated Peptide Receptors (FPRs). FPRs/ANXA1 interaction induces MMP2 activity through MAP Kinase and STAT3 pathways. ANXA1-stimulated MMP2 induces a significant increase of cell invasion ability. We also show that ANXA1 is externalized and localized on the cell surface where it is cleaved by a serine protease, which could be nicalin. ANXA1 cleavage occurs after Serine 28, a so far not described site. These data suggest that ANXA1 cleavage might be associated with invasion ability of melanoma cells by release of pro-invasive peptide(s). These findings identify ANXA1 as a melanoma proinvasive protein that might be a promising prognosis marker and therapeutic target.

**Key words:** melanoma, dissemination, ANXA1, FPRs, protéomic, cleavage





## **Liste des abréviations**

### **A**

AACR: American Association for Cancer Research  
ABC: ATP-Binding Cassette  
ACN: Acétonitrile  
ADN: Acide DésoxyriboNucléique  
AJCC: l'American Joint Committee on Cancer  
AKT: Protein Kinase B  
ALM: Mélanome Acral Lentigineux  
ANXA1: Annexine A1  
AP-2: Activator Protein-2  
APEX1: Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease1  
APC: Adenomatous Polyposis Coli  
ARF: Alternate Reading Frame  
ATF-1: Activating Transcription Factor-1  
ATF2: Activating Transcription Factor 2

### **B**

BAD: Bcl2 Associated Death promoter  
BCL2: B-Cell Leukemia/Lymphoma 2  
bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor  
BIRC7: Baculoviral IAP Repeat Containing 7

### **C**

CAML1: Cell Adhesion Molecule L1  
CDK: Cyclin Dependent Kinase  
CDKN2A: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A  
CRE : cAMP Response Element  
CPA: cellules présentatrices d'antigène  
cPLA2: phospholipase A2 cytosolique  
CtBP-1: C terminal Binding Protein 1  
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4  
CTNNB1 : Caténine (cadherin-associated protein), B1  
CREB: cAMP-responsive element binding protein  
CXCL8: Interleukin 8

### **D**

DIAPH1: Diaphanous Homolog 1



## **E**

EGF: Epidermal Growth Factor  
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor  
EMMPRIN: Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer  
ERK: Extacellular signal-Regulated Kinase  
ET: Endothélines

## **F**

FDA: Food and Drugs Administration  
fMLP: N-formyl-Methionine-Leucine-Phenylalanine  
FPR: Formyl Peptide Receptor

## **G**

GDP: Guanosine Diphosphate  
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor  
GSK3b: Glycogen Synthase Kinase 3b  
GTP: Guanosine Triphosphate

## **H**

HDM: Human Double Minute 2  
HGF: Hepatocyte Groth Factor  
HIF1 $\alpha$ : Hypoxic Inducible Factor 1 alpha

## **I**

ICAM: Intercellular Cell Adhesion Molecule  
IKK: Inhibitor of Nuclear Factor kappa B Kinase  
IL-8 : Interleukin 8  
InVS : Institut de Veille Sanitaire  
INK4A: Cyclin Dependent Kinase 4 inhibitor A  
ITGB1BP1: Integrin beta 1 Binding Protein 1

## **J**

JAK : Janus Kinase  
JDE : Jonction Dermo-Epidermique  
JNK: C-Jun N-Terminal Kinase

## **L**

LC: Liquid Chromatography  
Lck: Lymphocyte Cell-specific protein-tyrosine Kinase  
LFA-1: Leukocyte Function-Associated molecule 1



LIF: Leukemia Inhibitory Factor

Lyn: Tyrosine-protein Kinase

## **M**

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MCAM: Melanoma Celladhesion Molecule

MCL-1: Myeloid leukemia Cell Differentiation Protein 1

MEC: Matrice Extra Cellulaire

MEK: Mitogen-activated protein Kinase

MITF: Microphthalmia-Associated Factor

MLIAP: Melanoma Inhibitor of Apoptosis

MMP: Matrix Metalloprotease

MS: Mass Spectrometry

MT1: Metallothionein-1

MTIC: (3-methyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide

## **N**

NEMO: NFκB Essential Modulator

NFκB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGF: Nerve Growth Factor

NM: Mélanome Nodulaire

NOMO : Nodal Modulator

## **O**

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

## **P**

PAR1: Protease-Activated Receptor-1

PD-1: Programmed Death 1

PDGF: Plateletderived Growth Factor

PD-L1: Programmed Death Ligand1

PG: Prostaglandines

PI3K: Phosphoinositide 3 Kinase

PIP2: Phosphoinositide bis Phosphate

PIP3: Phosphoinositide triphosphate

PKA: Protéine Kinase A

PKC: Protéine Kinase C

PLC: Phospholipase C

POMC: Proopiomélanocortine

PP2A: Protein Phosphatase 2A

PR3 : Proteinase 3

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog



## **R**

RAF: Murine sarcoma viral oncogene homolog b1  
RAS : Rat sarcoma virus  
RB: Retinoblastoma protein  
Ref1: Redox Factor-1  
RGP: Radial Growth Phase  
RIP1: Receptor Interacting Protein 1  
RTK: Récepteur à Tyrosine Kinase

## **S**

SAA: Serum Amyloid protein A  
SCF: Stem Cell Factor  
Src: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase  
SSM: Mélanome Superficiel Extensif  
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

## **T**

TBX2 : T-Box transcription factor 2  
TCR : T cell Receptor  
TEM: Transition Epithelio-Mesenchymateuse  
TGF $\beta$ : Tumor Growth Factor  $\beta$   
TIMP: Inhibiteurs de Métallo-protéases tissulaires  
TMZ: Temozolomide  
TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha  
TRAIL: Tumor necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

## **U**

uPA: Urokinase Plasminogen Activator  
UV: Ultra Violet

## **V**

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule  
VEGF et VEGFR : Vascular Endothelial Growth factor et son récepteur  
VGP: Vertical Growth Phase  
VLA-4: Very late Antigen 4

## **W**

Wnt: Wingless integration site





## **Liste des figures**

### **Introduction**

**Figure 1:** Les différentes couches de l'épiderme

**Figure 2:** Schéma représentant la structure de la jonction dermo-épidermique

**Figure 3:** Schéma d'une coupe transversale de la peau avec les trois tissus la constituant

**Figure 4:** Représentation schématique des différents stades de la mélanogenèse

**Figure 5:** Chaîne de synthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine

**Figure 6:** Homéostasie des mélanocytes dans la peau humaine

**Figure 7:** Schéma de la voie de signalisation au sein de l'unité épidermique de mélanisation

**Figure 8:** Illustration des quatre grandes variétés de mélanomes

**Figure 9 :** Illustration des paramètres mesurés pour l'indice de Breslow et l'indice de Clark et Mihm

**Figure 10 :** Modèle d'apparition et de propagation du mélanome cutané

**Figure 11:** la signalisation des facteurs de croissances est transmise par les récepteurs à activité tyrosine kinase

**Figure 12:** Voie PI3K-AKT

**Figure 13:** Voie Wnt/ $\beta$ -caténine

**Figure 14:** Fonction des protéines codées par CDKN2A

**Figure 15:** Cibles géniques régulées par CREB et AP2 $\alpha$

**Figure 16:** Implication des STATs dans la propagation du mélanome cutané

**Figure 17:** Cibles géniques de MITF

**Figure 18:** Implication de l'intégrine  $\alpha\beta3$  dans l'invasion cellulaire

**Figure 19:** Implication d'ICAM1 dans l'extravasation



**Figure 20:** Profil des MMPs durant les phases de développement du mélanome

**Figure 21:** Voies de signalisations contrôlées par EGFR, c-KIT et c-MET

**Figure 22:** Mélanome cutané et immunothérapie

**Figure 23:** Voies de signalisation activées par c-KIT et inhibiteurs associés

**Figure 24:** Mécanismes de résistance mis en place par les cellules de mélanome suite à l'inhibition de BRAF

**Figure 25 :** Structure des membres de la famille des annexines

**Figure 26:** Structure tridimensionnelle du corps protéique de l'annexine A1

**Figure 27:** Chémoattraction des neutrophiles vers le site d'infection

**Figure 28:** Rôle de l'annexine A1 dans la résolution de l'inflammation

**Figure 29:** les modes d'activation des FPRs par ANXA1

**Figure 30:** Rôle d'ANXA1 dans le trafic membranaire

**Figure 31:** Induction de la prolifération par la phospholipase A2 dans les cellules épithéliales

## **Matériels et méthodes**

**Figure 1 :** Schéma de la procédure d'enrichissement en annexines

## **Résultats et discussions**

### **Partie I : Implication de l'annexine A1 dans l'invasion du mélanome cutané**

**Figure 1:** ANXA1 increases *in vitro* invasion and spontaneous metastases in B16B16 model

**Figure 2:** High ANXA1 expression in human primary tumours reduced metastasis free survival

**Figure 3:** Expression of ANXA1 and FPR in human melanocytes and melanoma cell lines



**Figure 4:** hANXA1<sub>2-26</sub> peptide enhanced *in vitro* melanoma invasion through FPR

**Figure 5:** FPRs/hANXA1<sub>2-26</sub> interaction is followed by an increase in MMP2 activity

**Figure 6:** FPRs/hANXA1<sub>2-26</sub>-induced MMP2 activity is mediated by MAP Kinases and STAT3 pathways in melanoma cell lines

## **Partie II : Expression des annexines et caractérisation du clivage d'ANXA1 dans le mélanome**

**Figure 1:** Evaluation de l'enrichissement en ANXA1 par précipitation au calcium

**Figure 2:** Profilage des annexines par précipitation au calcium

**Figure 3:** Mise en évidence de l'ANXA6 tronquée

**Figure 4:** ANXA1 clivée est plus présente dans les lignées de mélanome les plus invasives

**Figure 5 :** Le clivage d'ANXA1 se produit après la serine 28

**Figure 6 :** ANXA1 est clivée par une protéase à sérine dans la lignée A375

**Figure 7 :** ANXA1 clivée se trouve exclusivement à la surface cellulaire

**Figure 8 :** La sérine protéase responsable du clivage d'ANXA1 est localisée au niveau membranaire

**Figure 9 :** Fractionnement des protéases membranaires des cellules A375 clivant ANXA1

## **Discussion et conclusion générales**

**Figure 1:** schéma des voies de signalisation activées par ANXA1

**Figure 2:** schéma hypothétique de l'externalisation d'ANXA1



## **Liste des tableaux**

### **Introduction**

**Tableau 1:** Classification selon l'indice de Breslow et le niveau de Clark

**Tableau 2:** Système de classification de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) en 2002

**Tableau 3:** Tableau récapitulatif des différentes protéases clivant ANXA1

**Tableau 4:** Changement d'expression des annexines dans différents cancers

### **Matériels et méthodes**

**Tableau 1 :** Nature et concentration des inhibiteurs de protéases testés

**Tableau 2 :** Anticorps primaires utilisés pour les Western blot

**Tableau 3 :** Composition des tampons utilisés pour la purification de l'ANXA1 recombinante

### **Résultats et discussions**

#### **Partie I : Implication de l'annexine A1 dans l'invasion du mélanome cutané**

**Table1:** Patient characteristics and clinical data

**Table 2:** Multivariate analysis for time to metastasis (MFS)

#### **Partie II : Expression des annexines et caractérisation du clivage d'ANXA1 dans le mélanome**

**Tableau 1:** Les différentes annexines identifiées par MALDI-TOF MS

**Tableau 2:** protéases identifiées dans les fractions d'intérêt





# INTRODUCTION



Ce travail de thèse a débuté en Janvier 2011 dans l'UMR 990 intitulée « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée ». Le projet de ce laboratoire de recherche est de développer des nouvelles stratégies de vectorisation pour la détection et le traitement du mélanome et des pathologies du cartilage. Les vecteurs marqués par un radio-isotope peuvent être utilisés en imagerie afin de diagnostiquer ou de suivre les pathologies ciblées, mais peuvent aussi servir pour concentrer une thérapie (radio ou chimiothérapie) spécifiquement dans les cellules cibles.

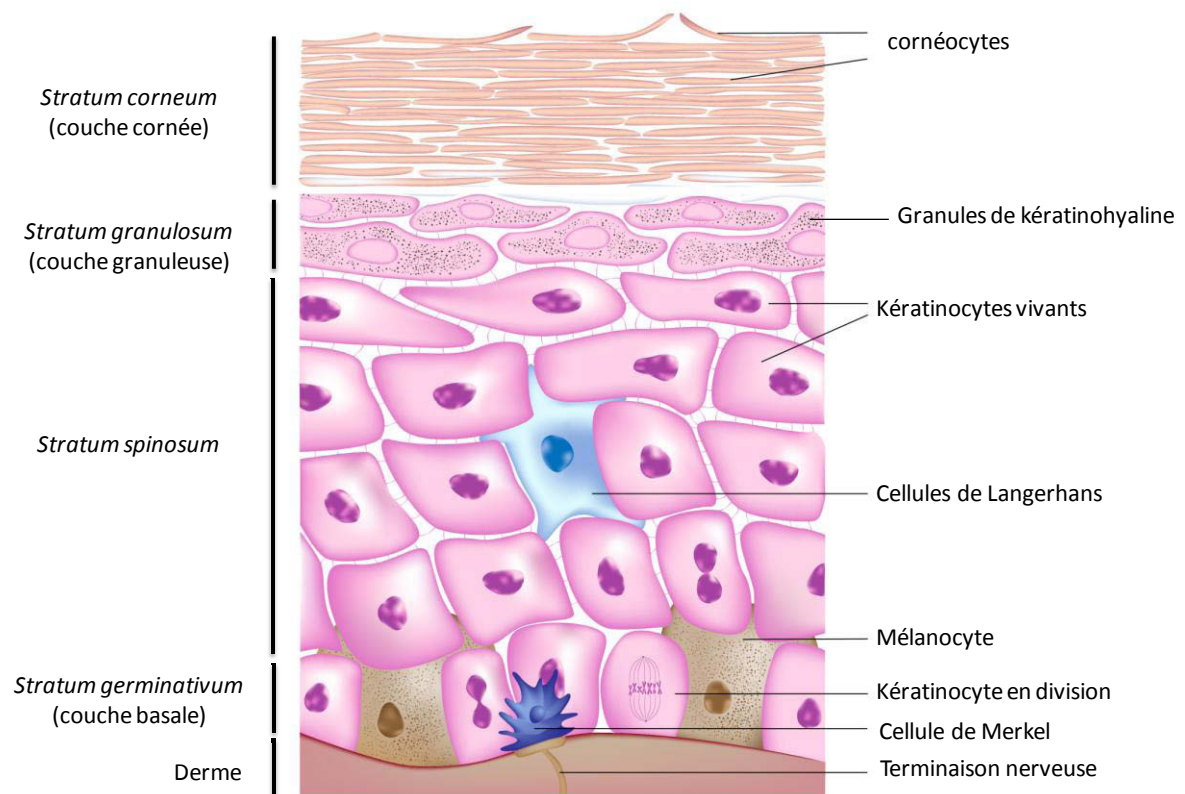
Le mélanome cutané est un cancer très agressif dont l'incidence a fortement augmenté au cours des dernières décennies. Il se développe à partir des mélanocytes et peut rapidement former des métastases. Le manque de traitement efficace et la grande capacité de cette tumeur à disséminer explique l'importante mortalité associée au mélanome. En France, environ 10 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année et 1500 décès/an sont associés à ce cancer. Il y a donc une nécessité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux marqueurs pronostiques afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Le projet développé au cours de cette thèse « **Rôles et modes d'action de l'annexine A1 dans la dissémination du mélanome cutané** » a pris naissance grâce à l'identification, dans un modèle murin, de l'annexine A1 comme un marqueur potentiel de la propagation du mélanome cutané murin. L'objectif de la thèse a été de vérifier la valeur pronostique de l'annexine A1 dans le mélanome humain, d'identifier les mécanismes par lesquels cette protéine module l'invasion cellulaire et enfin de caractériser son mode d'action.

Avant de présenter les résultats obtenus, les données actuelles sur le mélanome cutané sont présentées dans une bibliographie non exhaustive. Des données sur la peau puis sur le mélanome sont développées, ensuite les différentes étapes de la progression du mélanome, et enfin les données sur le traitement sont présentées. La dernière partie porte sur la structure, la fonction et les conséquences de la dérégulation de l'annexine A1.



# BIBLIOGRAPHIE



**Figure 1: Les différentes couches de l'épiderme**

Le *Stratum germinativum*, Le *Stratum spinosum*, Le *Stratum granulosum* et Le *Stratum corneum*.

[www.oleassence.fr](http://www.oleassence.fr)

## La peau

La peau joue un rôle extrêmement important dans la protection du corps humain de son environnement. Elle fournit une barrière pour les facteurs chimiques, mécaniques et microbiens qui peuvent perturber la physiologie du corps humain. En plus de cette fonction de barrière, la peau agit aussi comme un réseau immunitaire et, à travers ses pigments, fournit l'unique système de protection contre les radiations UV (Ultra Violet).

La peau est formée de trois couches superposées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

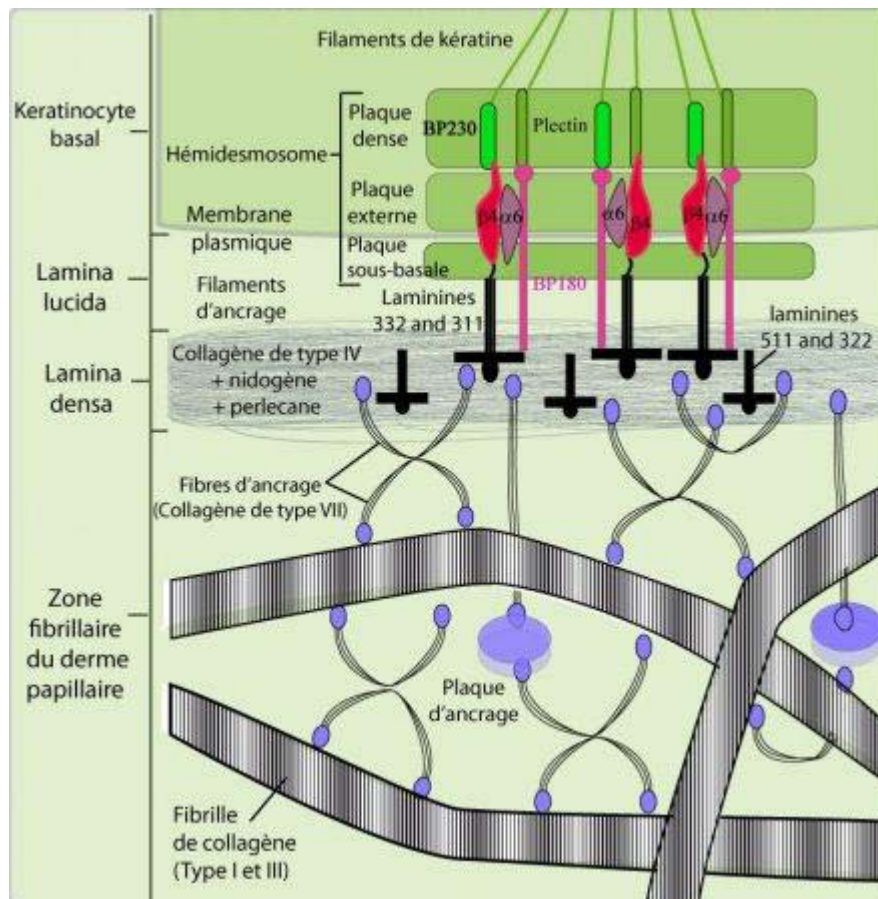
### **I- L'épiderme**

L'épiderme est une couche externe épithéliale stratifiée dépourvue d'apports vasculaires et nerveux. L'épiderme a une épaisseur d'environ 5 à 100 µm (qui peut atteindre jusqu'à 600 µm dans les paumes des mains et les plantes des pieds) (1). Cette couche contient plusieurs populations cellulaires ; les kératinocytes et les mélanocytes sont les constituants majeurs. L'épiderme est organisé en quatre couches (**Figure 1**).

- Le Stratum germinativum (aussi appelé la couche basale) est constitué de cellules attachées à la membrane basale qui séparent l'épiderme du derme. Cette couche contient essentiellement des kératinocytes, des cellules de Merkel (cellules neuroendocriniennes responsables de la transmission de la sensation du toucher à travers les nerfs cutanés) et des mélanocytes.
- Le *Stratum spinosum* contient des kératinocytes avec des capacités de division limitées et des cellules de Langerhans (cellules présentatrices d'antigène)
- Le *Stratum granulosum* (appelé aussi couche granuleuse) contient des kératinocytes incapables de se diviser et qui ont la capacité de produire des granules de kératinohyaline (précurseur de la kératine). Ces cellules sont écrasées et poussées vers la surface de la peau par les cellules en division dans la couche sous-jacente
- Le *Stratum corneum* (aussi appelé couche cornée) contient des cornéocytes

La différenciation des kératinocytes commence dans le Stratum germinativum et se termine dans les couches superficielles. Au fur et à mesure de leur différenciation, les





**Figure 2: Schéma représentant la structure de la jonction dermo-épidermique**

La jonction dermo-épidermique relie les kératinocytes de la couche basale au derme papillaire. Les différentes couches de la jonction ainsi que les molécules associées sont présentées.

<http://www.biologiedelapeau.fr/>

kératinocytes accumulent la kératine et perdent progressivement les organelles cytoplasmiques. Ce sont ces cellules qui forment une barrière pour les agents physiques, chimiques et pathogènes (2).

## **II- La jonction dermo-épidermique**

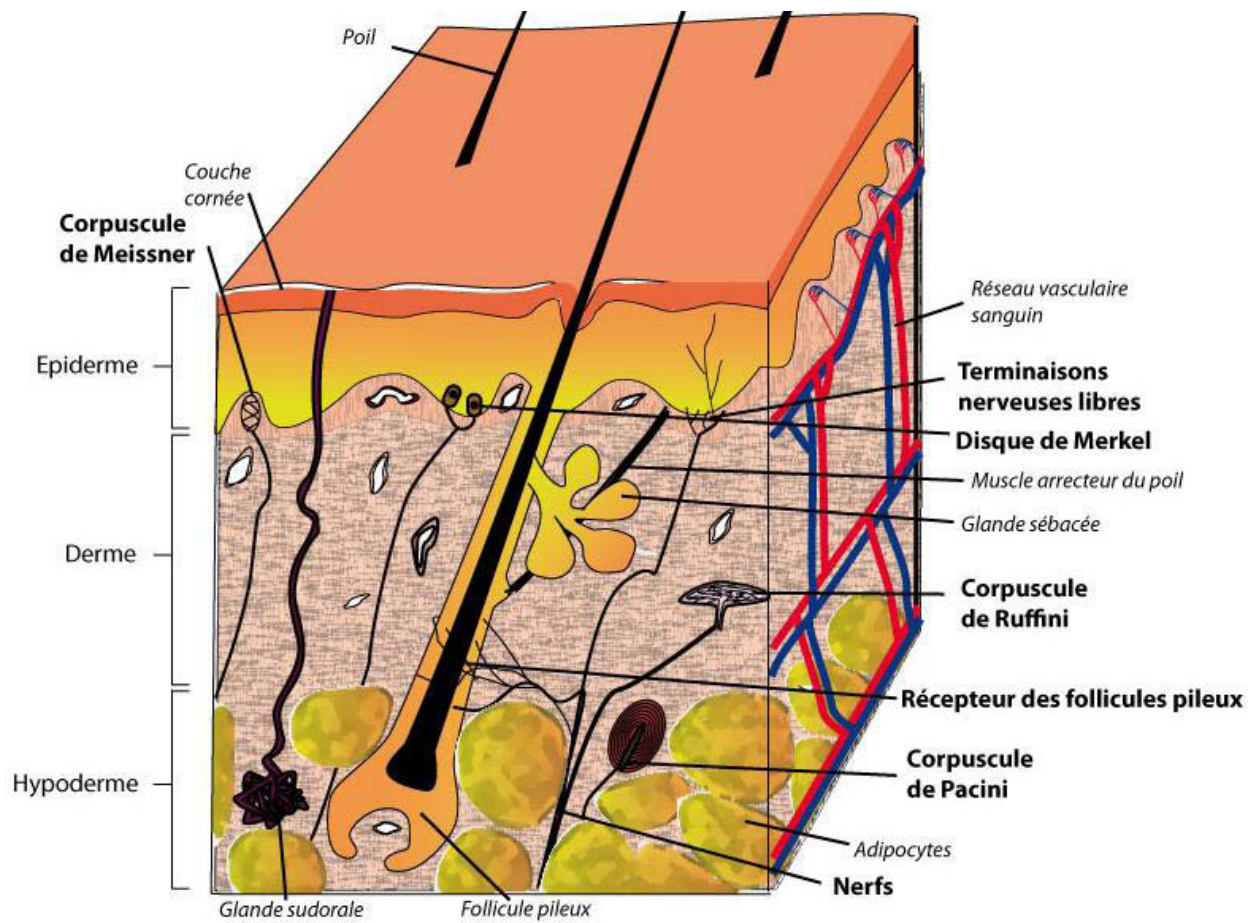
Également appelée lame basale épidermique, la jonction dermo-épidermique (JDE) est une structure fine d'origine à la fois dermique et épidermique dont le principal rôle structural est d'assurer un accrochage solide entre le derme et l'épiderme. D'une épaisseur d'environ 100 nm, la JDE est elle-même divisée en 4 couches distinctes (**Figure 2**) :

- la membrane plasmique des cellules de la couche basale de l'épiderme avec au niveau des kératinocytes basaux des structures d'attache : les hémidesmosomes
- la lamina lucida est traversée par les filaments d'ancrage (laminines 1, 5 et 6). Ces filaments sont retrouvés en grande quantité au niveau des hémidesmosomes et forment un réseau avec la partie extracellulaire des intégrines  $\alpha 6\beta 4$  présentes à la surface des kératinocytes
- la lamina densa est majoritairement composée de collagène de type IV, mais des protéoglycannes comme le perlécan, du nidogène et de la laminine 1 sont retrouvés au sein de cette structure
- la zone fibrillaire contient des fibres d'ancrage composées de collagène de type VII. Ces fibres sembleraient être en contact étroit avec la laminine 5 des fibrilles d'ancrage

La JDE assure le soutien entre l'épiderme et le derme et permet également la migration des kératinocytes, essentielle dans le processus de cicatrisation cutanée, ainsi que les échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments.

## **III- Le derme**

Le derme est une couche, de 2 à 4 mm d'épaisseur, contenant des fibroblastes et qui abrite l'appareil vasculaire, lymphatique, neuronal et sécréteur de la peau (**Figure 3**). Les cellules majoritaires sont les fibroblastes, ils sont essentiels pour la synthèse et la dégradation de la matrice extra cellulaire (MEC). En plus des cellules du système immunitaire comme les macrophages et les mastocytes, le derme contient des glandes sécrétrices et excrétrices, des follicules pileux et des composantes du système nerveux sensoriel.



**Figure 3: Schéma d'une coupe transversale de la peau avec les trois tissus la constituant**  
 L'épiderme, le derme et l'hypoderme.  
[www.biologiedelapeau.fr](http://www.biologiedelapeau.fr)

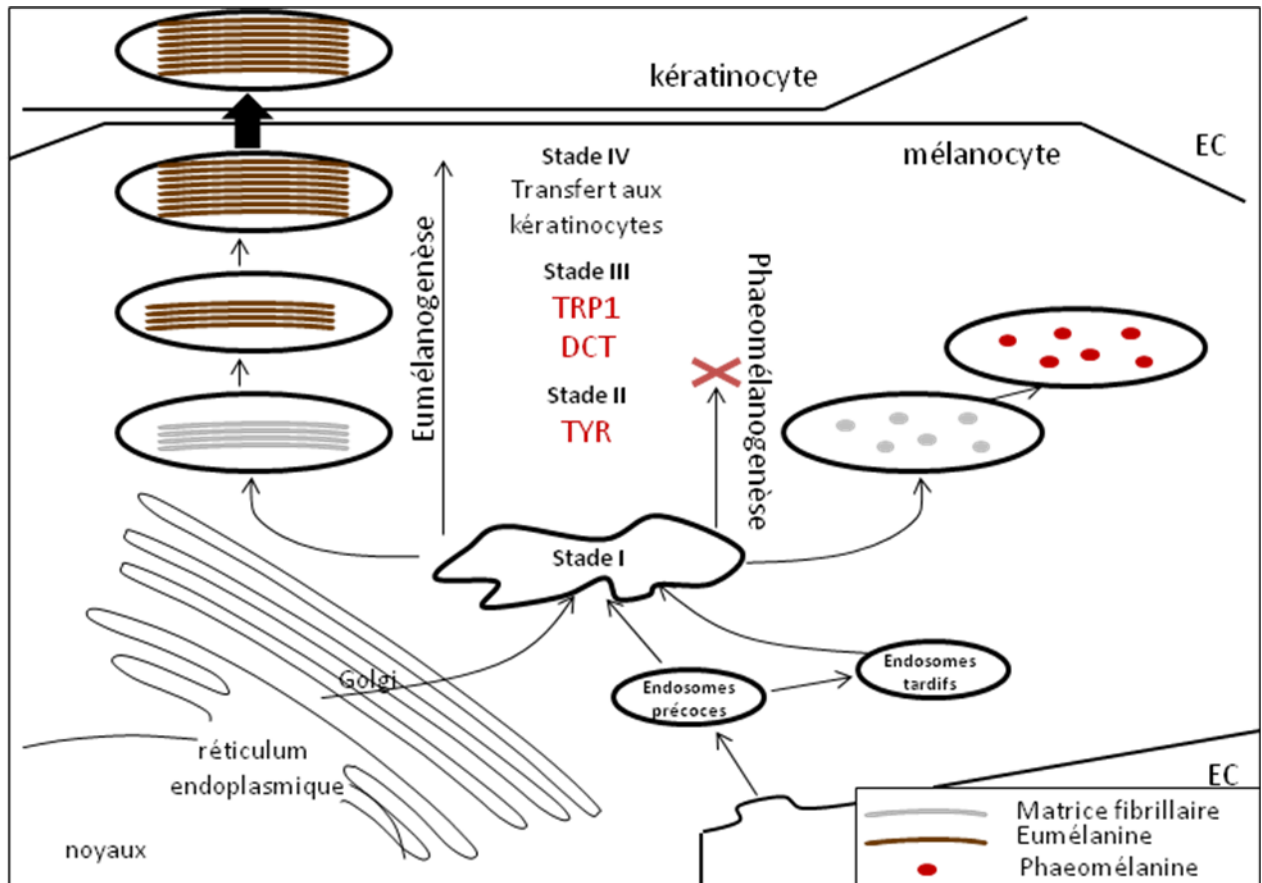
- Les glandes sécrétrices et excrétrices : les glandes sébacées secrètent du sébum qui est constitué essentiellement de triglycérides et de cholestérol. Ces glandes assurent la lubrification de la peau et la rendent souple et étanche à l'eau
- Les follicules pileux et les ongles : en plus de générer la racine du cheveu, les follicules pileux fournissent une niche protectrice pour différentes populations de cellules souches cutanées requises pendant le processus de cicatrisation. Les cellules souches cutanées sont principalement formées des cellules souches des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules souches épidermiques de la crête neurale et du compartiment dermique (3,4)
- Le système nerveux sensoriel : il est formé par les corpuscules de Meissner et de Rufini qui permettent la perception des différents aspects du toucher

La matrice dermique est constituée de :

- Collagène : responsable de l'intégrité du derme et de sa résistance à la traction
- Elastine : responsable de l'élasticité de la peau
- Protéoglycanes : responsables de la raideur de la peau
- Glycoprotéines : impliquées dans l'adhérence, la migration et la communication cellulaire

#### **IV-L'hypoderme**

Il s'agit de la couche la plus profonde de la peau qui lie le derme avec les couches musculaires sous-jacentes. Il est constitué principalement de lobules graisseux formés par les agrégats d'adipocytes dont le cytoplasme varie de volume selon les stocks lipidiques qu'il contient. Ces stocks sont variables selon l'âge, le sexe et l'alimentation des individus et aussi selon la partie du corps concernée. De plus, il comporte un composant du système nerveux sensoriel formé par les corpuscules de Pacinian, impliqués dans la transmission des signaux de pression) (**Figure 3**). Les stocks lipidiques de l'hypoderme lui confèrent un rôle de réserve énergétique et permettent aussi d'isoler l'organisme des déperditions de chaleur et d'absorber les chocs.



**Figure 4: Représentation schématique des différents stades de la mélanogenèse**

Le pré-mélanosome de stade 1 est généré par la fusion d'endosomes (précoces ou tardifs) et de protéines structurales et enzymatiques issues du réticulum endoplasmique et du Golgi. Certains mélanosomes stoppent leur croissance au stade II et synthétisent la phaeomélanine ; d'autres poursuivent leur maturation au stade III où ils acquièrent des enzymes nécessaires à la synthèse d'eumélanine (TRP1 : tyrosin-related protein 1 ; DCT : dopachrome tautomérase). Au stade IV, la synthèse d'eumélanine se poursuit et les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes. EC : extracellulaire <sup>(7-9)</sup>

---

## Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules hautement différenciées responsables de la biosynthèse de la mélanine dans des organelles appelées mélanosomes. Les mélanosomes sont transférés, *via* les dendrites émises par les mélanocytes, aux kératinocytes environnants là où ils jouent un rôle photo-protecteur. Les contacts entre mélanocytes et kératinocytes forment une unité épidermique de mélanisation. Chaque unité contient un mélanocyte et environ 40 kératinocytes provenant des couches basales de l'épiderme.

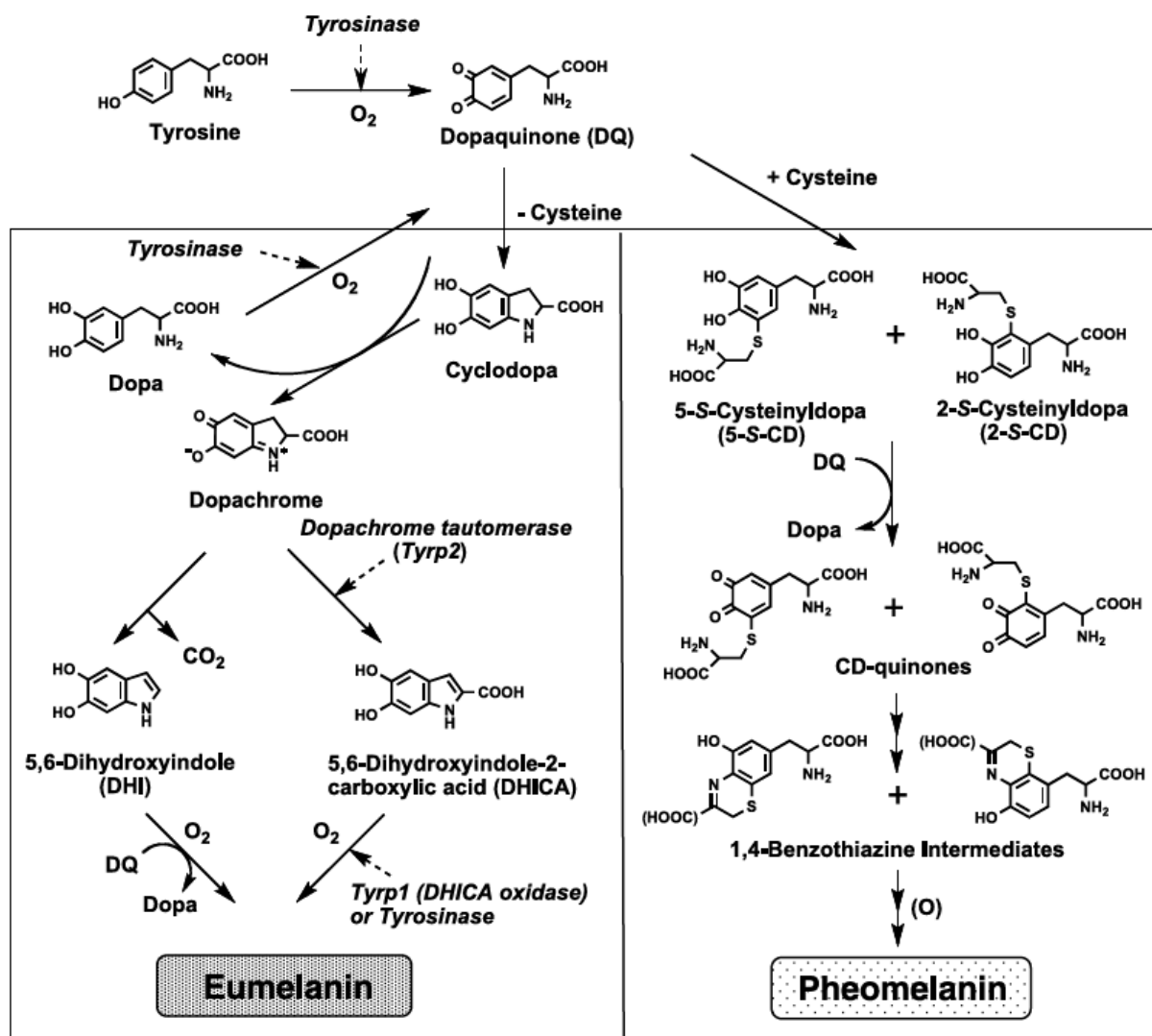
### **I- Origine et différenciation**

Les mélanocytes sont issus de la différenciation de cellules progénitrices appelées mélanoblastes. Les mélanoblastes proviennent de la crête neurale. Entre la 10<sup>ème</sup> et la 14<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire humain, les mélanoblastes migrent tout au long du mésenchyme embryonnaire pour atteindre, dans la peau, l'épiderme et les follicules pileux. La migration durant l'embryogenèse dépend des interactions entre les récepteurs à la surface des cellules et leurs ligands extracellulaires. Par exemple, SCF (stem cell factor) se lie au récepteur KIT des mélanoblastes pour stimuler la migration [5].

Une fois que les mélanoblastes ont atteint leurs destinations finales, ils se différencient en mélanocytes.

### **II- Mélanosomes**

Les mélanocytes contiennent des mélanosomes qui sont des organelles spécialisés dans la synthèse de la mélanine. Les mélanosomes, passent par 4 stades de maturation (I-IV) qui sont déterminés par leur structure et aussi par la quantité, la qualité et l'arrangement de la mélanine produite. Les mélanosomes naissants sont assemblés dans la région périnucléaire près de l'appareil de Golgi à partir des endosomes primitifs et des lysosomes pour recevoir les enzymes et les protéines requises pour la mélanogenèse. Les mélanosomes de stade I sont des vacuoles sphériques dépourvues de protéines de structures et de tyrosinase, enzyme essentielle à la mélanogenèse. La présence de la protéine Pmel17, une protéine de structure, et sa fragmentation déterminent la transformation mélanosomale du stade I au stade II où les mélanosomes sont fibrillaires et allongés. La synthèse de la mélanine débute quand l'organisation des fibres est complète, c'est-à-dire au stade III, après fusion d'un mélanosome de stade II avec une vésicule provenant de l'appareil de Golgi contenant les enzymes



**Figure 5: Chaîne de synthèse de l'eumélanine et de la phéomélanine**

Selon la disponibilité de l'acide aminé cystéine.

Ito 2005 <sup>(4)</sup>

nécessaires pour la synthèse de mélanine. Le dernier stade de développement des mélanosomes est le stade IV. A ce stade les mélanosomes sont remplis de mélanine et deviennent sombres (**Figure 4**) [6]. Les mélanosomes sont de deux types, selon la nature de la mélanine qu'ils contiennent. Les mélanosomes contenant la phéo-mélanosome stoppent leur maturation au stade II et restent arrondis et non fibrillaires (**Figure 4**) (5, 7-9).

### **III- Mélanine et mélanogénèse**

Les deux types de mélanine produite par les mélanocytes ont des propriétés chimiques et des couleurs distinctes. L'eumélanine est marron-noire, la pheomélanine est jaune-rouge. Ces deux types de mélanine ont des réponses opposées à une irradiation par des UV. L'eumélanine, contenant peu de soufre, agit comme un agent photoprotecteur antioxydant alors que la pheomélanine qui contient beaucoup de soufre est un agent phototoxique pro-oxydant [10]. Ces deux pigments sont généralement en mélange. C'est le ratio entre les deux mélanines qui va déterminer la couleur de la peau (11).

La mélanogénèse est un processus qui est induit par la stimulation du récepteur de la mélanocortine de type I (MC1R). La fixation de l'alpha melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ MSH) sur ce récepteur va favoriser la synthèse d'eumélanine alors que la fixation de la protéine Agouti va engager la voie pheomélanine (12). L'activation des récepteurs MC1R va enclencher une cascade de signalisation qui va aboutir à la transcription du facteur microphthalmia-associated transcription factor (MITF) (13). MITF va, à son tour, favoriser la transcription des gènes codants pour des enzymes impliquées directement dans la mélanogénèse comme la tyrosinase, TRP1 et TRP2 (14).

La première étape de la synthèse de la mélanine commence par l'hydroxylation par la tyrosinase de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) puis en DOPAquinone. Selon la disponibilité de la cystéine, et donc du soufre, il y aura synthèse d'eumélanine ou de pheomélanine (**Figure 5**) (10).

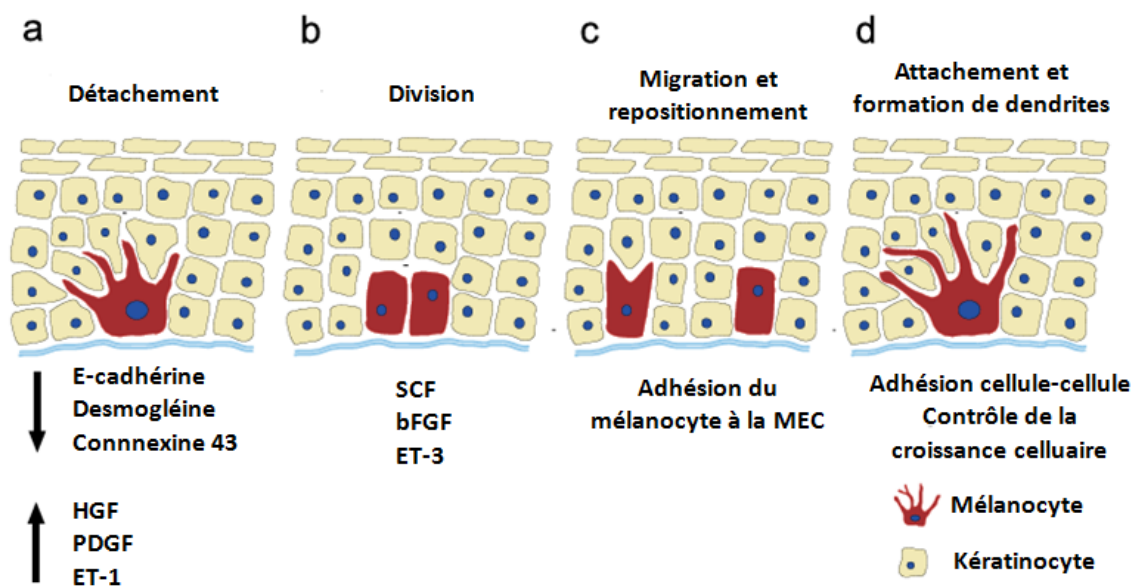
### **IV-Unité épidermique de mélanisation**

L'unité épidermique de mélanisation est une unité structurelle et fonctionnelle au sein de l'épiderme contenant deux types cellulaires : les mélanocytes et les kératinocytes.

Les mélanocytes de l'adulte prolifèrent ponctuellement en réponse à des stimuli spécifiques comme l'exposition au soleil et lors de la cicatrisation.

Afin de proliférer, les mélanocytes ont besoin de se détacher de la membrane basale et de rétracter leurs dendrites, cela se produit par la perte des E-cadhérines, desmoglénines et





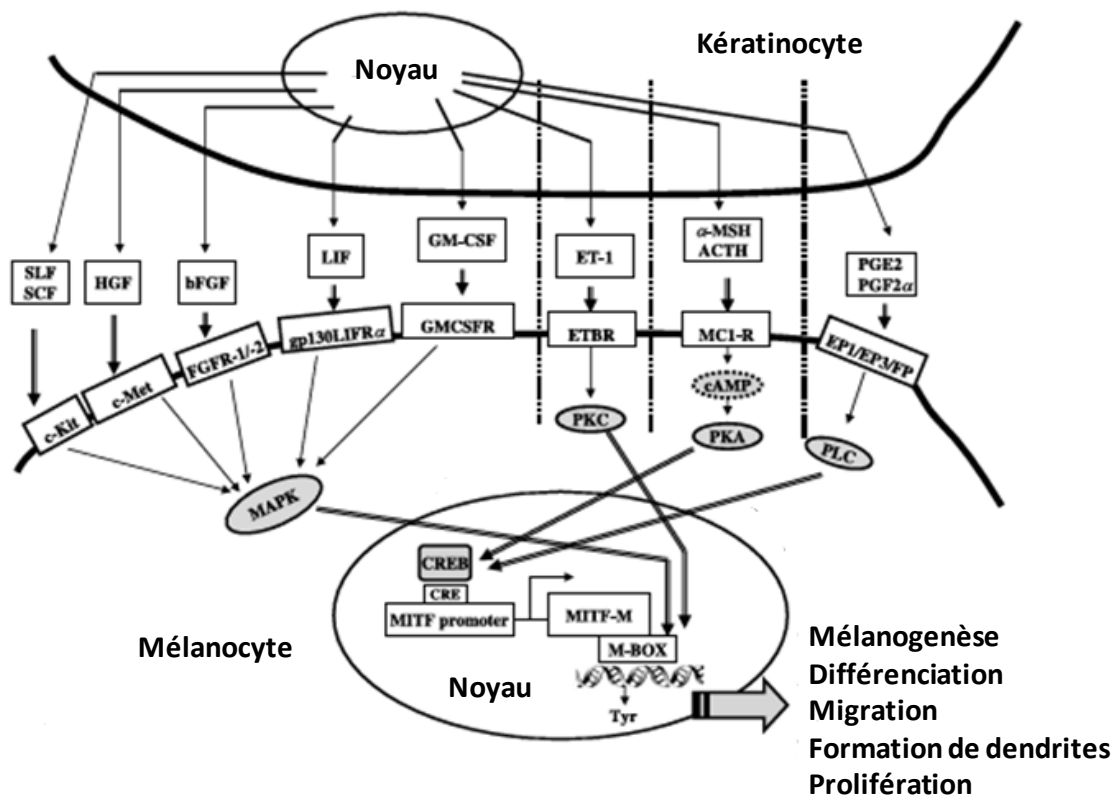
**Figure 6: Homéostasie des mélanocytes dans la peau humaine**  
*Haass 2005* <sup>(15)</sup>

connexines 43, molécules essentielles dans les liaisons mélanocytes-MEC et mélanocytes-kératinocytes. Ces processus se produisent en réponse à la libération par les kératinocytes de facteurs de croissance comme HGF, PDGF et ET-1 dans le microenvironnement (**Figure 6a**). La division des mélanocytes se fait ensuite en réponse aux SCF, bFGF et ET-3 produits par les kératinocytes (**Figure 6b**). Les mélanocytes migrent le long de la membrane basale et une fois qu'ils ont atteint leur destination finale, ils se lient à la MEC (**Figure 6c**) et aux kératinocytes, par émission de nouvelles dendrites, pour former une nouvelle unité épidermique de mélanisation au sein de laquelle les kératinocytes contrôlent leur croissance (**Figure 6d**) (15).

La variation de la couleur de la peau est gouvernée principalement par le statut en mélanine, et par le nombre et la distribution des mélanosomes produits et transférés par chaque mélanocyte vers les kératinocytes environnants. Une fois dans les kératinocytes, la mélanine s'accumule autour des noyaux. Elle peut ainsi absorber les UV avant que ces derniers atteignent les noyaux et provoquent des mutations géniques (16). Le complexe mélanocyte-kératinocyte répond rapidement à de nombreux stimuli environnementaux souvent de façon paracrine et autocrine. En effet, les mélanocytes répondent aux UV, à la protéine Agouti, à l' $\alpha$ MSH, aux endothélines, aux facteurs de croissance, aux cytokines, etc.

Après une exposition aux UV, les mélanocytes augmentent l'expression de la proopiomélanocortine (POMC, précurseur d'  $\alpha$ MSH) et son récepteur MC1R, la tyrosinase et TYRP1, la protéine kinase C (PKC) et d'autres facteurs. De plus, il est connu que les UV stimulent la production d'endothélines (ET-1) et la POMC par les kératinocytes (17). Ces facteurs peuvent agir alors de façon paracrine pour stimuler les mélanocytes. Les mélanocytes sont également sensibles aux cytokines, aux facteurs de croissance et aux médiateurs inflammatoires produits par les fibroblastes de la peau. Ces derniers peuvent induire la mélanogenèse et/ou stimuler le transfert de la mélanine vers les kératinocytes.

Les facteurs de croissance n'affectent pas seulement la croissance et la pigmentation des mélanocytes, mais l'émission des dendrites, l'adhésion à la MEC et la motilité.  $\alpha$ MSH, ACTH, bFGF (basic fibroblast growth factor), NGF (nerve growth factor), endothéline, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), SCF, SLF, LIF (leukemia inhibitory factor) et HGF (hepatocyte growth factor) sont des facteurs sécrétés par les kératinocytes et responsables de la prolifération et/ou la différenciation des mélanocytes (**Figure 7**).



**Figure 7: Schéma de la voie de signalisation au sein de l'unité épidermique de mélanisation**

Mécanisme par lequel les facteurs sécrétés par les kératinocytes stimulent la mélanogenèse, la prolifération, la migration, la formation de dendrites et la différenciation des mélanocytes.

Costin 2007<sup>(5)</sup>

- L' $\alpha$ MSH et l'ACTH se fixent sur MC1R qui, par l'intermédiaire d'une protéine G, active une adénylate cyclase qui à son tour convertit l'ATP en AMPc. L'AMPc exerce son effet en partie à travers la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle CREB (cAMP response element binding protein). Cette protéine se lie à cAMP response element (CRE) présent sur le promoteur M du gène *MITF*. L'augmentation de l'expression de MITF va stimuler la production de TYR, TYRP1 qui vont induire la mélanogenèse (13).
- ET-1 se lie au récepteur couplé aux protéines G ETBR localisé à la surface des mélanocytes. L'activation de ces récepteurs mobilise le calcium intracellulaire et active PKC. Ces événements sont à l'origine de la formation de dendrites, de la migration et de la mélanogenèse (18, 19).
- Les prostaglandines (PG) E2 et PGF2 activent les récepteurs EP1, EP3 et FP. Cette activation induit l'émission de dendrites de façon AMPc indépendante et serait médiée par la phospholipase C (PLC).
- GM-CSF, LIF, bFGF, HGF et SCF activent respectivement les récepteurs GMCSFR, LIFR alpha, FGFR, c-Met et c-kit. L'activation de ces récepteurs va stimuler la mélanogenèse mais surtout la prolifération cellulaire *via* la voie Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (5, 20).



---

## **Le mélanome cutané**

Les cancers cutanés sont des tumeurs développées à partir des cellules de la peau. Les cancers de la peau peuvent être classés selon le tissu qui en est à l'origine :

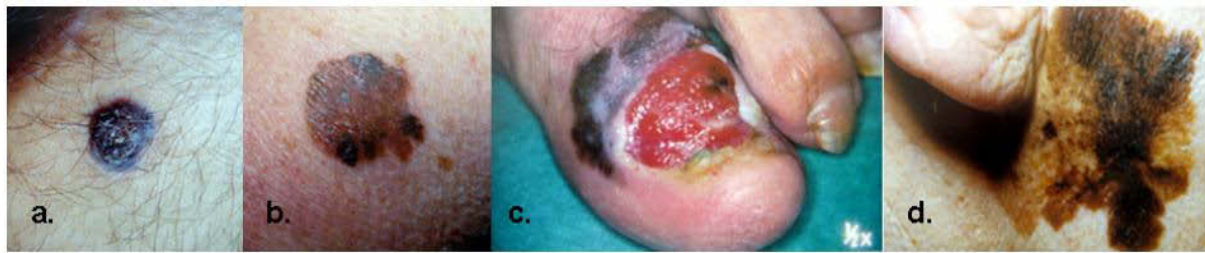
- Les épithéliomes, dérivant du tissu épithélial, eux-mêmes composés de deux grands groupes de carcinomes : le carcinome basocellulaire et le carcinome spinocellulaire.
- Les mélanomes, développés à partir des mélanocytes.
- Les sarcomes, développés à partir du tissu conjonctif.

Le mélanome cutané est le résultat d'un dysfonctionnement génétique et/ou fonctionnel de plusieurs protéines et voies de signalisation clés du mélanocyte. Ces dérégulations conduisent à une perturbation du cycle cellulaire et à une altération des interactions de la cellule avec son environnement matriciel et cellulaire. C'est la forme la plus agressive des cancers cutanés car il a la capacité de métastaser. Bien qu'il représente environ 4% des cancers de la peau, le mélanome est responsable de 80% des décès dus aux tumeurs cutanées. Cette forte mortalité est due d'une part à sa forte capacité invasive et d'autre part au manque de traitement efficace sur la maladie disséminée. Néanmoins, le diagnostic précoce est crucial, car à ce stade la plupart des mélanomes sont curables par exérèse chirurgicale.

### **I- Epidémiologie**

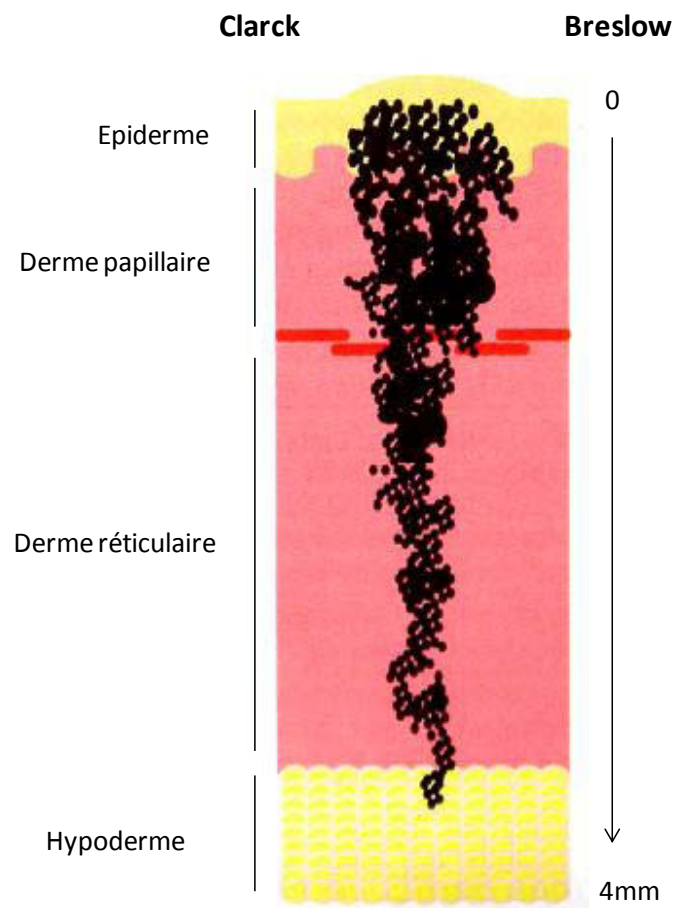
La société américaine de recherche sur le cancer AACR estime à 1,6 million le nombre de nouveaux cas de cancers cutanés en 2012 aux Etats Unis et 12 190 décès sont causés par cette pathologie la même année. Bien que le mélanome cutané représente une faible proportion de ces nouveaux cas (76 250), il est à l'origine de 9 180 décès. Par ailleurs, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2012, le nombre de nouveaux cas de mélanomes dans le monde est de 200 000 et les décès associés sont de 65 000, cela reflète la forte mortalité associée à cette pathologie (21).

Durant les dernières décennies l'incidence du mélanome cutané n'a pas cessé d'augmenter. A titre d'exemple, en Australie, parmi les cancers à forte incidence, le mélanome cutané a été classé 3ème en 2008 avec 1082 nouveaux cas (<http://health.wa.gov.au/wacr>). Chez les jeunes (15-39 ans), c'est le cancer le plus fréquent chez les hommes et le deuxième chez les femmes.



**Figure 8: Illustration des quatre grandes variétés de mélanomes**

a. mélanome nodulaire, b. mélanome superficiel extensif, c. mélanome acral lentigineux ulcéré unguéal et péri unguéal du gros orteil, d. lentigo malin de Dubreuilh (d'après Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles, 3ème édition, édition Masson)



**Figure 9 : Illustration des paramètres mesurés pour l'indice de Breslow (épaisseur de la tumeur en millimètres) et l'indice de Clark et Mihm (degré d'envahissement)**

D'après Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles, 3ème édition, édition Masson.

En France, l'incidence du mélanome a été estimée à 8,12 pour 100.000 individus en 2008, bien plus faible qu'en Australie où l'incidence est de 35 pour 100.000 individus la même année (<http://globocan.iarc.fr/>). Cependant, les projections établies pour l'année 2011 par l'institut de Veille Sanitaire (InVS), ont évalué d'une part l'incidence du mélanome cutané à 2,7% de la totalité des cancers affectant la population Française. D'autre part, le nombre de décès a été estimé à 1618 pour 10.000 cas nouvellement diagnostiqués. Ces projections classent le mélanome cutané parmi les cancers à forte incidence, au 9<sup>ème</sup> rang, avec 9780 nouveaux cas et le mettent respectivement au 12<sup>ème</sup> et au 14<sup>ème</sup> des cancers les plus mortels chez les hommes et les femmes.

## **II- Classification anatomo-clinique**

Il est admis que le mélanome se développe schématiquement en deux phases : une phase de croissance horizontale et une phase de croissance verticale (dite invasive) pendant laquelle le mélanome atteint le derme. L'examen histologique permet d'affirmer la nature et l'agressivité de la tumeur.

L'OMS ainsi que les agences nationales de santé ont classé les différentes formes de mélanome cutané en quatre principales catégories anatomo-clinique (**Figure 8**) :

- Le mélanome nodulaire (NM) est le mélanome le plus agressif avec un pronostic très défavorable. Il représente 10 à 20% des cas et il est caractérisé par un passage rapide en phase verticale.
- Le mélanome superficiel extensif (SSM) représente la majorité des mélanomes (60 à 70% des cas). C'est le mélanome le moins agressif, la première phase de croissance radiale peut durer des années.
- Le mélanome acral lentigineux (ALM) représente 2 à 10% des cas et se développe au niveau des doigts, orteils, paumes et plantes.
- Le lentigo malin de Dubreuilh représente 5 à 10% des cas et se développe au niveau des zones qui ont subi de longues expositions au soleil (des décennies). Ce mélanome touche principalement des sujets âgés.



<b>A)</b>	<b>Mélanome primitif, après exérèse</b>	<b>Risque de récurrence</b>	<b>Risque d'être décédé après 5 ans</b>	<b>Risque d'être décédé après 10 ans</b>
	Intra-épithélial	0 %	/	/
	Breslow : 0,20-0,75 mm	< 10 %	< 5 %	< 5 %
	Breslow : 0,75-1,5 mm	20 %	10 %	15 %
	Breslow : 1,5-4 mm	40 %	30 %	40 %
	Breslow : > 4 mm	70 %	40 %	50 %

<b>B)</b>	<b>Niveau I</b>	mélanome intra-épidermique sans risque métastatique
	<b>Niveau II</b>	invasion d'une partie du derme papillaire
	<b>Niveau III</b>	invasion de tout le derme papillaire ne dépassant pas l'interface avec le derme réticulaire
	<b>Niveau IV</b>	invasion du derme réticulaire
	<b>Niveau V</b>	invasion de l'hypoderme

**Tableau 1: Classification selon l'indice de Breslow et le niveau de Clark**

(A) Corrélation entre l'indice de Breslow et les risques de récurrence et décès après 5 et 10 ans. (B) Niveaux d'invasion selon Clark et Mihm (d'après Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles, 3<sup>ème</sup> édition, édition Masson).

<b>0</b>	Mélanome <i>in situ</i>
<b>IA</b>	Tumeur ≤ 1,0 mm sans ulcération avec un niveau de Clark II ou III
<b>IB</b>	Tumeur < 1,0 mm avec ulcération ou niveau de Clark IV ou V, ou tumeur de 1,01 – 2,0 mm sans ulcération
<b>IIA</b>	Tumeur de 1,01 – 2,0 mm avec ulcération, ou tumeur de 2,01 – 4,0 mm sans ulcération
<b>IIB</b>	Tumeur de 2,01 – 4,0 mm avec ulcération, ou tumeur ≥ 4,0 mm sans ulcération
<b>IIC</b>	Tumeur > 4,0 mm avec ulcération
<b>IIIA</b>	Toute tumeur sans ulcération avec 1– 3 ganglions microscopiques
<b>IIIB</b>	Toute tumeur avec ulcération avec 1– 3 ganglions microscopiques, ou toute tumeur sans ulcération avec 1– 3 ganglions macroscopiques, ou toute tumeur avec ou sans ulcération mais avec métastase(s) satellite(s) ou en transit, sans métastase ganglionnaire
<b>IIIC</b>	Toute tumeur avec ulcération et 1 – 3 ganglions macroscopiques ou métastase(s) satellite(s) ou en transit, ou toute tumeur avec ≥ 4 ganglions métastatiques ou métastases satellites ou en transit avec ganglions métastatiques
<b>IV</b>	Toute tumeur, tous nombres de ganglions, et toutes métastases distantes, ganglionnaires ou viscérales

**Tableau 2: Système de classification de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) en 2002**

Les mélanomes sont classés selon l'indice de Breslow et les niveaux de Clark et en fonction de la présence de métastases et d'ulcération.

### **III- Critères du pronostic**

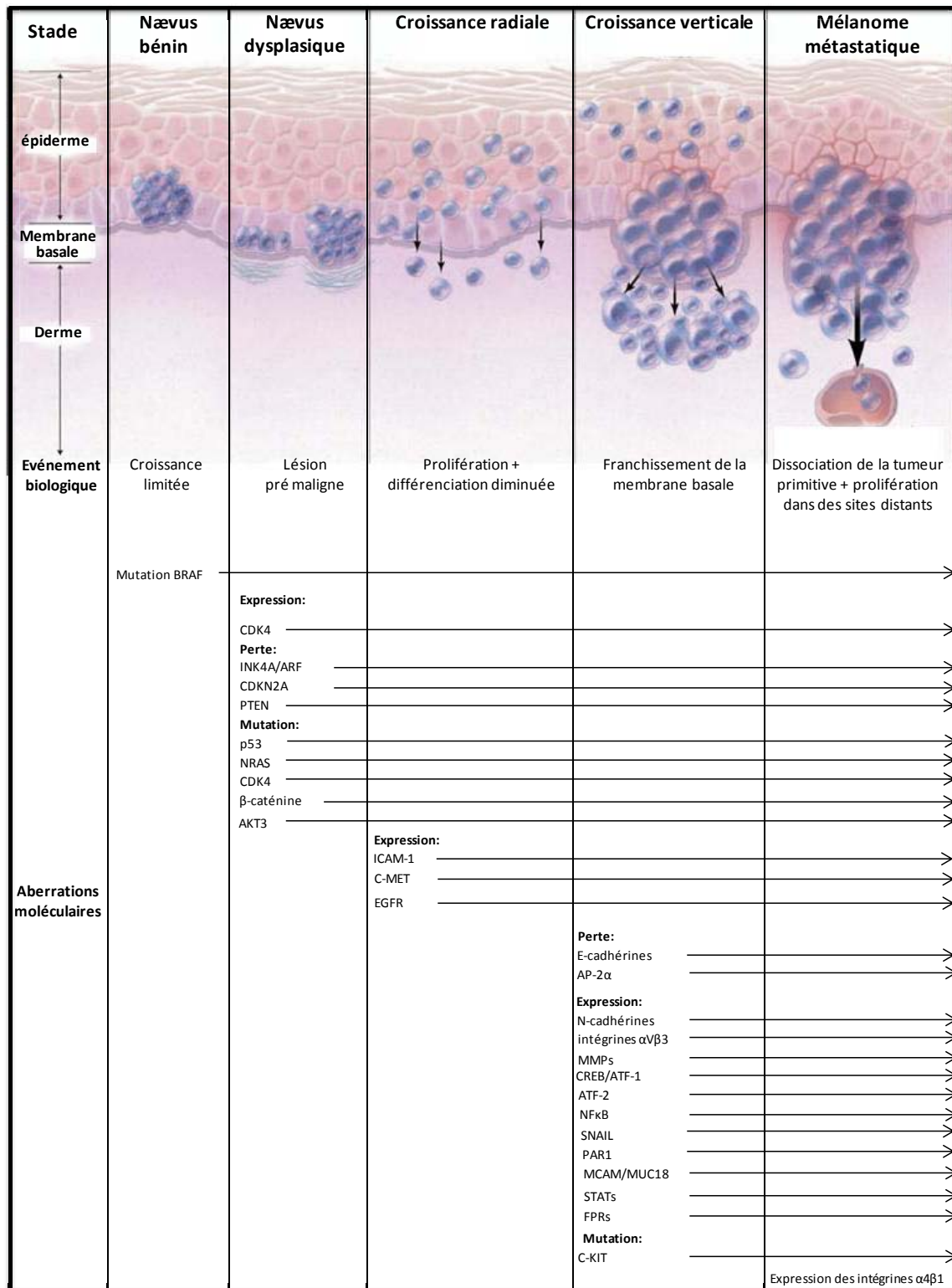
En cas de suspicion de mélanome, l'examen anatomopathologique de la lésion va permettre d'affirmer ou d'infirmer le diagnostic. Après exérèse de la lésion, des mesures de l'indice de Breslow et du niveau d'invasion selon Clark et Mihm sont déterminées (**Figure 9**) (22) :

- l'indice de Breslow correspond à la mesure en millimètres, sur coupe histologique standard, de l'épaisseur maximum comprise entre les cellules superficielles de la couche granuleuse épidermique et la base de la tumeur. Il existe une corrélation entre l'indice de Breslow et la survie (**Tableau 1A**).

- le niveau d'invasion selon Clark et Mihm est lié au franchissement de « barrières anatomiques » (**tableau 1B**)

### **IV-Classification internationale**

Un système de classification des mélanomes a été proposé à l'échelle internationale. Validée par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) en 2002, cette classification se base sur l'examen de 17 600 patients recensés dans 13 centres de traitement du mélanome à travers le monde (23). Cette classification prend en compte l'indice de Breslow, le niveau d'invasion selon Clark et Mihm, les ulcérations et les métastases ganglionnaires et viscérales (**Tableau 2**).



**Figure 10 : Modèle d'apparition et de propagation du mélanome cutané**

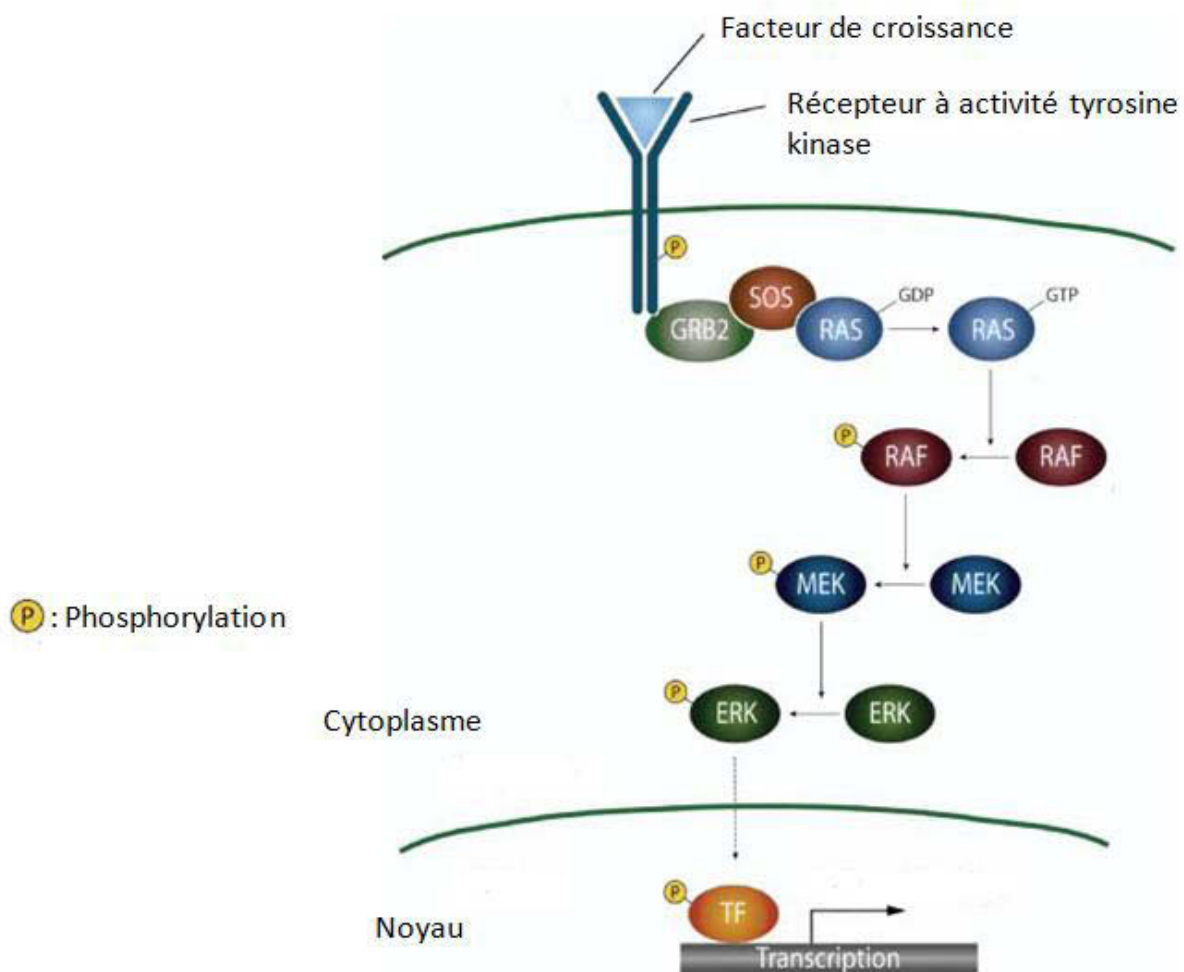
Les changements moléculaires impliqués dans la transformation maligne des mélanocytes et dans la progression depuis l'épiderme jusqu'à la circulation sanguine/lymphatique. Il faut noter que le mélanome peut se développer aussi à partir de mélanocytes.

Miller 2006 <sup>(27)</sup>

### **Du mélanocyte au mélanome**

Le mélanome cutané résulte d'une succession de transformations qui se produisent au niveau des mélanocytes donnant naissance à des cellules hautement prolifératives et invasives. A travers des altérations génétiques, les mélanocytes normaux peuvent se transformer en nævus bénin. Des altérations supplémentaires conduisent à la transformation de ce dernier en nævus dysplasique (lésion pré maligne) puis en une lésion à croissance radiale (RGP) et enfin verticale (VGP) permettant aux cellules tumorales d'envahir les tissus sous-jacents et d'atteindre la circulation sanguine et lymphatique (**Figure 10**).

Pendant la phase RGP, les cellules tumorales sont localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme, au dessus de la JDE. Elles acquièrent des propriétés prolifératives et deviennent résistantes à l'apoptose. Pendant la phase VGP, certaines cellules au sein de la lésion primitive vont acquérir des capacités invasives qui leur permettent de dégrader les composants de la JDE et d'envahir le derme. Cette étape se caractérise par le changement du répertoire des molécules d'adhésion exprimées. Cela va permettre à la lésion d'une part de se détacher des kératinocytes et d'échapper à leur contrôle et d'autre part d'établir de nouvelles interactions avec les fibroblastes et les cellules endothéliales situées dans le derme. De plus, pendant cette phase, les cellules cancéreuses ont la capacité de sécréter des protéases permettant de dégrader la JDE et de migrer vers le derme. C'est la transition pseudo épithélio-mésenchymateuse (24). Dans le derme, les cellules métastatiques vont adhérer et dégrader la MEC et migrer à travers la membrane basale de l'espace subendothélial jusqu'aux veinules post-capillaires et aux vaisseaux lymphatiques (**Figure 10**) (25). Une fois au niveau de la circulation, une grande partie des cellules tumorales est éliminée par des contraintes mécaniques et immunitaires. Les cellules survivantes vont arriver au niveau du lit capillaire périphérique à l'organe cible, adhérer à la membrane basale de l'espace subendothélial, extravaser, migrer à travers la MEC et former des colonies au niveau du nouveau site métastatique. Une induction de la néoangiogenèse est alors requise pour assurer la survie des cellules métastatiques (25). Lors du processus de dissémination, les cellules tumorales sont en constante sélection par l'environnement. Ceci est à l'origine de l'émergence de clones caractérisés par une prolifération incontrôlée, résistants à l'apoptose, hautement invasifs avec des propriétés incluant l'adhésion, la motilité et la protéolyse extracellulaire (26, 27).



**Figure 11: la signalisation des facteurs de croissances est transmise par les récepteurs à activité tyrosine kinase**

A la suite de la fixation d'un ligand, le récepteur s'autophosphoryle et se lie à RAS par l'intermédiaire de différentes protéines adaptatrices. Quand RAS est activé il enclenche une cascade de phosphorylations impliquant RAF, MEK et ERK. ERK activé passe au niveau nucléaire et active différents facteurs de transcription importants pour la prolifération cellulaire.

*Dahl 2007* <sup>(54)</sup>

La **figure 10** montre une liste, non exhaustive, des acteurs moléculaires qui peuvent être dérégulés à chaque étape de la progression du mélanome. Dans la partie suivante, ces dérégulations sont développées et les acteurs décrits sont classés en 8 groupes: protéines associées à la voie MAPK, à la voie PI3K/PTEN et à la voie  $\beta$ -caténine, protéines régulant le cycle cellulaire, facteurs de transcription, molécules d'adhésion, métallo-protéases et récepteurs membranaires.

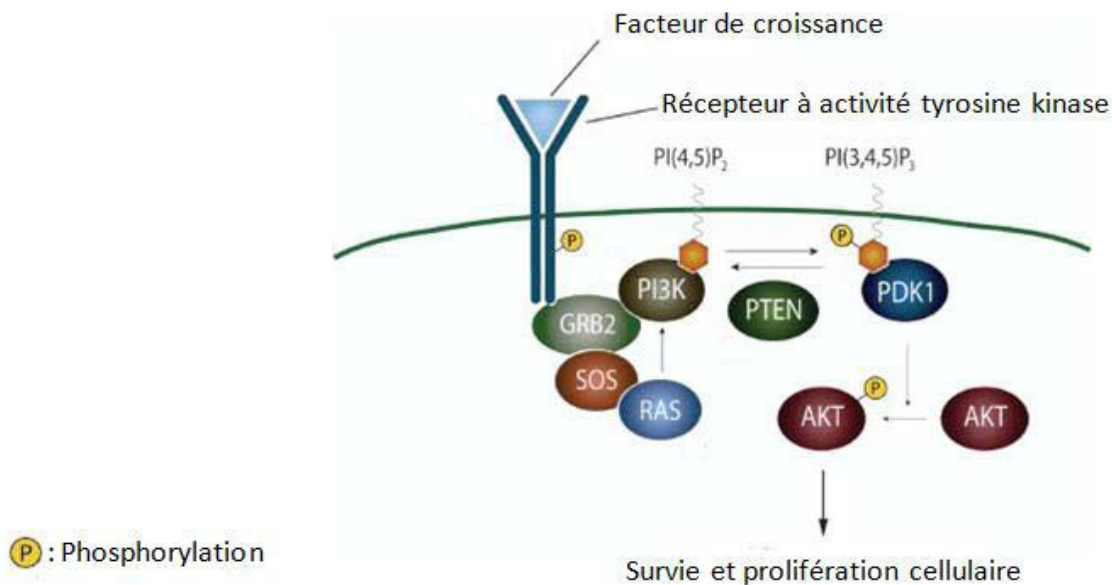
## **I- Protéines associées à la voie MAPK**

### **1) NRAS**

NRAS appartient à la famille des protéines G qui sont capables de lier le GTP (Guanosine triphosphate) et le GDP (Guanosine diphosphate) et qui inclut aussi HRAS et deux variants de KRAS (28). En réponse à différents stimuli cellulaires, comme ceux portés par les récepteurs à activité tyrosine kinase, RAS lie le GTP et se trouve dans un état actif permettant de recruter RAF au niveau de la membrane plasmique et par une cascade de phosphorylation il active l'axe RAF-MEK-ERK (**Figure 11**). La mutation de NRAS est retrouvée dans 23% des mélanomes (29). Il s'agit dans la majorité des cas d'une substitution de la glutamine 61 par une arginine, une lysine ou encore une leucine. Cette mutation perturbe l'hydrolyse du GTP et maintient la protéine sous une forme constitutivement active. Des mutations touchant KRAS et HRAS sont retrouvées dans différents cancers, mais rarement dans le mélanome, reflétant ainsi la dépendance de l'activité des différentes isoformes de RAS au contexte cellulaire (30, 31).

### **2) BRAF**

RAF, effecteur en aval de RAS, est une sérine/thréonine protéine kinase activatrice de MEK. Une fois phosphorylée, MEK phosphoryle à son tour ERK et l'active (**Figure 11**). Dans le génome humain, il existe trois gènes de RAF: ARAF, BRAF et CRAF (32). BRAF est retrouvé muté dans différents cancers et particulièrement dans le mélanome avec une fréquence de 50 à 60% (33). Une mutation spécifique, la substitution de la valine 600 par un acide glutamique (V600E), compte pour plus de 90% de toutes les mutations BRAF dans le mélanome. Cette mutation provoque un changement de la conformation de la kinase au niveau de son site actif lui conférant une activité constitutive (34). Le variant BRAF (V600E) est retrouvé dans plus de 80% des nævi dysplasiques bénins suggérant que cette mutation représente l'un des premiers événements de la néoplasie mélanocytaire (35).



**Figure 12: Voie PI3K-AKT**

Après l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase par un facteur de croissance, PI3K est activé et convertit le PIP2 en PIP3. Cette activation conduit à la phosphorylation d'AKT qui va par la suite stimuler différentes protéines impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire. PTEN inhibe cette voie en déphosphorylant le PIP3.

*Dahl 2007* <sup>(54)</sup>

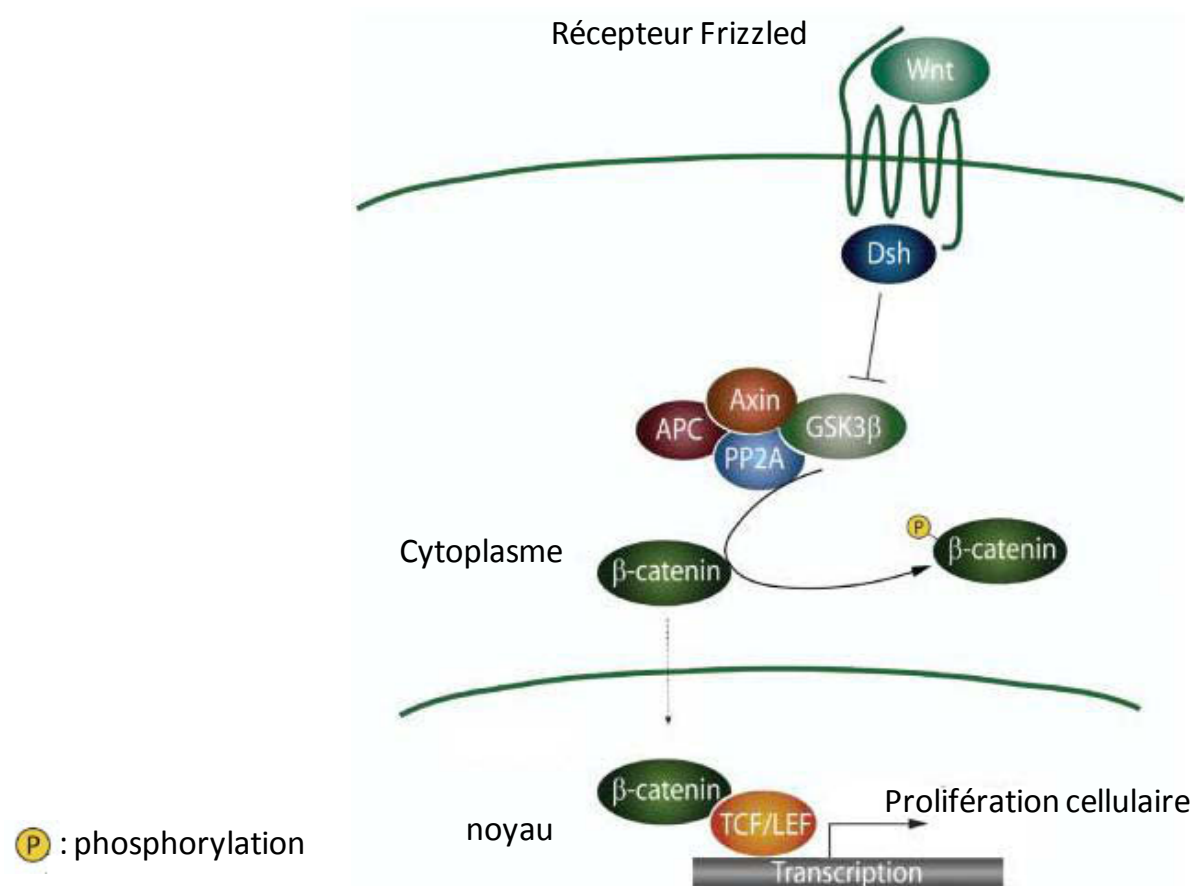
La mutation de BRAF coïncide rarement avec celle de RAS dans la même tumeur [36-38] suggérant que ces deux mutations sont toutes les deux efficaces pour activer l'axe MEK-ERK. Les mutations NRAS et BRAF sont retrouvées dans 80 à 90% des mélanomes ce qui montre l'importance de la voie MAPK dans le développement du mélanome et indique que l'activation de l'axe RAS-RAF-MEK-ERK est un passage obligatoire pour la transformation mélanocytaire.

La mutation de BRAF peut être détectée à la fois au niveau des lésions malignes et au niveau des naevi bénins [39]. Dans les naevi, il a été proposé que BRAF maintient la sénescence cellulaire [40, 41]. Paradoxalement, l'inactivation de l'oncogène BRAF seul peut bloquer la croissance tumorale et la formation de métastases dans les modèles de xénogreffe de mélanome humain et chez des patients avec un mélanome métastatique [42, 43]. Cela démontre que (1) malgré la multitude des aberrations au niveau du génome des cellules cancéreuses, la suppression d'une seule altération moléculaire pourrait inhiber significativement la croissance tumorale [44]; (2) les mutations oncogéniques coopèrent avec d'autres changements épigénétiques et d'autres modifications d'expression génique pour stimuler la transformation depuis un phénotype RGP vers un phénotype VGP métastatique.

## **II- Protéines associées à la voie PI3K/ PTEN**

PTEN (phosphatase and tensin homolog) est un régulateur négatif des signaux de croissance extra cellulaires qui sont transmis par la voie PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)-AKT (Protein Kinase B) (**Figure 12**). En réponse à ces signaux, PI3K phosphoryle le phosphoinositide bis phosphate (PIP2) localisé au niveau membranaire et le convertit en un second messenger, le phosphoinositide triphosphate (PIP3). Le PIP3 phosphoryle et active AKT qui à son tour stimule tout un réseau de facteurs contrôlant la prolifération et la survie cellulaire (**Figure 12**). PTEN a une activité phosphatase qui contrecarre PI3K en déphosphorylant PIP3 et inhibant ainsi le rôle d'AKT dans la survie et la prolifération. Dans le mélanome, le gène *PTEN* peut subir des mutations inhibitrices (par délétion ou insertion) qui lèvent le contrôle sur PI3K et favorisent ainsi la croissance tumorale [45]. Le gène *PI3K* peut aussi subir des mutations, au niveau de son site catalytique, la rendant constitutivement active [46]. Dans le cas du mélanome, il a été observé, que l'hyperactivité de la voie PI3K-AKT est très fréquente. Cependant, la présence des mutations de *PTEN* est observée dans moins de 30% des cas et les mutations de *PI3K* sont très rares dans le mélanome (<5%) [47, 48]. Cela suggère la présence d'autres aberrations permettant l'activation d'AKT. En effet, il





### Figure 13: Voie Wnt/β-caténine

A la suite de l'activation des récepteurs Frizzled par Wnt, le complexe APC, PP2A, Axine et GSK3β est déstabilisé, ce qui empêche la dégradation de la β-caténine qui va pouvoir s'accumuler dans le cytoplasme et dans le noyau. La β-caténine nucléaire joue le rôle d'un cofacteur de transcription de gènes tumorigènes.

Dahl 2007 <sup>(54)</sup>

a été montré que la voie PI3K peut être activée par la voie MAPK et particulièrement par NRAS, du fait d'une mutation activatrice, (Figure 12) mais aussi par le récepteur cKit qui se trouve en amont de NRAS [49]. Il a aussi été montré que l'augmentation de l'activité de la voie PI3K peut résulter de l'amplification du nombre de copies d'AKT3. Cette aberration est retrouvée dans 40 à 60% des mélanomes [50].

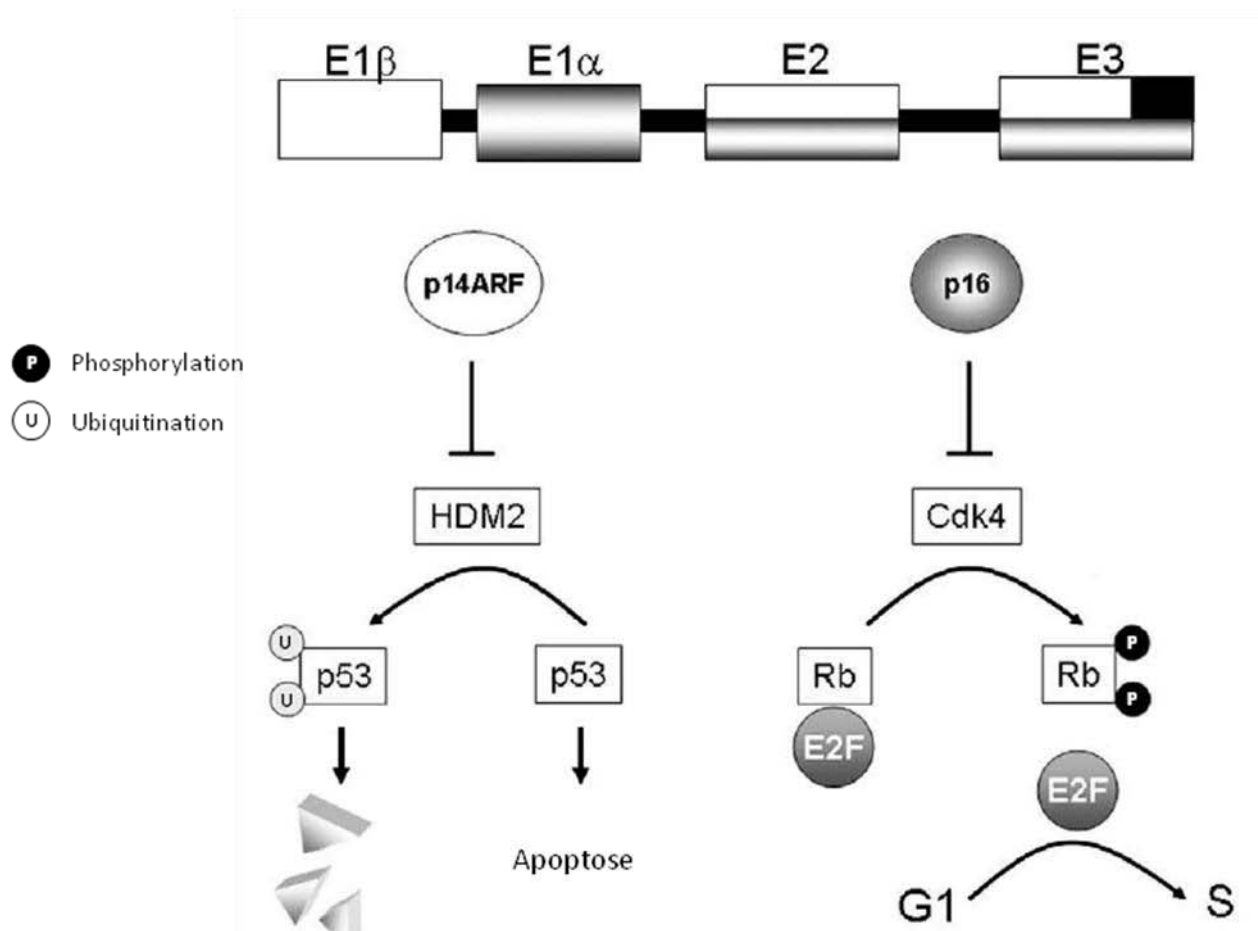
### **III- Protéines associées à la voie $\beta$ -caténine**

La  $\beta$ -caténine est un acteur clé de la voie de signalisation induite par la famille des glycoprotéines Wnt (wingless integration site). Cette voie contrôle différentes fonctions cellulaires, et une dérégulation peut être à l'origine du développement et de la propagation de différents cancers [51]. En absence de Wnt, la  $\beta$ -caténine sous sa forme libre se lie à un complexe de dégradation formé par APC (adenomatous polyposis coli), axine, PP2A (protein phosphatase 2A) et GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3b) (**Figure 13**). La GSK3 $\beta$  phosphoryle la  $\beta$ -caténine au niveau de sites spécifiques dans sa partie N-terminale. Cette modification va permettre l'ubiquitination de la protéine et son adressage vers le protéasome pour sa dégradation. Lors de la fixation de Wnt au niveau de son récepteur, GSK3 $\beta$  est inhibée et la  $\beta$ -caténine s'accumule au niveau cytoplasmique et nucléaire. Elle va alors agir comme cofacteur transcriptionnel de gènes cibles, comme *c-Myc* et *cycline D1*, qui interviennent dans la prolifération et la survie, et *MMP2* et *MMP9*, qui sont responsables des processus d'invasion et en partie de la TEM [52, 53]. Les mutations du gène de la  $\beta$ -caténine (*CTNNB1*) sont retrouvées dans 2 à 8% des mélanomes [54]. Ces mutations affectent les sites de phosphorylation de la protéine dans sa partie N-terminale (Ser33, Ser37, Thr41 and Ser45) la rendant résistante à la dégradation par la voie ubiquitine/protéasome. L'accumulation de  $\beta$ -caténine peut être aussi la conséquence d'une mutation inhibitrice ou d'hyperméthylation du promoteur A1 d'*APC* [55].

### **IV-Protéines régulant le cycle cellulaire (INK4A/ARF)**

*CDKN2A* (cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2A gene) est un gène qui code pour des protéines régulant le cycle cellulaire. Lorsque ce gène est muté, le risque de développer un mélanome est considérablement augmenté, et il a été observé que 25 à 50% des mélanomes familiaux sont associés à la mutation de *CDKN2A* [56].

Selon le cadre de lecture, le locus *CDKN2A* code pour deux suppresseurs de tumeur, p16<sup>INK4A</sup> et p14<sup>ARF</sup> (appelé aussi ARF). Les gènes des deux protéines ont en commun l'exon 2 et l'exon



**Figure 14: Fonction des protéines codées par CDKN2A**

Selon le cadre de lecture, le locus CDKN2A code pour deux protéines p16<sup>INK4A</sup> inhibe CDK4 et bloque les cellules en phase G1; p14<sup>ARF</sup> inhibe HDM2 et laisse le suppresseur de tumeur p53 sous sa forme active.

*Nelson 2009* <sup>(57)</sup>

3 du locus *CDKN2A*. La différence réside dans l'épissage alternatif qui se produit au niveau de l'exon 1 afin d'attribuer l'exon 1 $\alpha$  à p16<sup>INK4A</sup> et l'exon 1 $\beta$  à p14<sup>ARF</sup> (**Figure 14**).

Bien que la majorité des mélanomes associés à une mutation de ce locus montre une perturbation de l'expression des deux protéines, il a été observé qu'il existe des mutations qui ne touchent qu'un seul des deux gènes. Cela suggère que p16<sup>INK4A</sup> et p14<sup>ARF</sup> exercent leur rôle via deux voies indépendantes [57].

#### 1) La voie p16<sup>INK4A</sup>-CDK4/6-Rb

p16<sup>INK4A</sup> inhibe la division cellulaire en bloquant les cellules en phase G1. En effet, p16<sup>INK4A</sup> séquestre CDK4 et CDK6 (cyclin-dependent kinases) et permet au suppresseur de tumeur Rb (retinoblastoma protein) de rester sous sa forme active non phosphorylée. L'inactivation de p16<sup>INK4A</sup> va permettre aux CDK de phosphoryler Rb et libérer le facteur de transcription E2F. E2F est à l'origine de l'entrée de la cellule dans la phase S du cycle cellulaire [58] (**Figure 14**).

L'inactivation du gène *INK4A* par mutation ponctuelle, délétion ou par méthylation de son promoteur est retrouvée dans la majorité des mélanomes sporadiques [59] et dans 30% des mélanomes familiaux [60]. L'inactivation de la voie p16<sup>INK4A</sup>-CDK4/6-RB peut se produire aussi par la mutation du gène *CDK4* rendant la protéine insensible à p16<sup>INK4A</sup>. Deux mutations ont été décrites, toutes les deux consistent à la substitution de l'arginine 24 par une cystéine ou une histidine [61]. Des cas d'amplification de *CDK4* ont été observés dans certains mélanomes sporadiques, particulièrement dans les mélanomes muqueux et acraux, avec une activité inchangée de p16<sup>INK4A</sup> [62, 63].

#### 2) La voie ARF-p53

ARF régule négativement la division cellulaire en régulant positivement p53. ARF se lie à HDM2 et l'inhibe. HDM2 a pour fonction de marquer les protéines par une ubiquitine afin de les adresser dans le protéasome pour leur dégradation. La mutation d'*ARF* altère sa liaison avec HDM2. HDM2 va rester sous sa forme libre et augmenter ainsi la dégradation de p53 (**Figure 14**) alors que l'un des rôles principaux de p53 est de détecter les dommages de l'ADN, d'induire la sénescence cellulaire et de permettre soit la réparation de l'ADN soit l'apoptose lorsque les dommages sont très importants [64].

Le suppresseur p53 est muté dans beaucoup de cancers. Néanmoins, dans le mélanome la fréquence de mutation de p53 est faible (<15%) [65, 66]. L'une des explications à cette faible



fréquence est que des gènes régulant p53 sont des cibles préférentielles pour les aberrations génétiques. En effet, la plupart des événements inactivant *INK4A* touchent aussi *ARF* ce qui engendre en conséquence une extinction de p53. Il a aussi été démontré que MDM4, autre régulateur négatif de p53, est surexprimé dans près de 65% des mélanomes permettant ainsi d'inhiber p53 [67].

Bien que la plupart des mutations touchant le gène *CDKN2A* se produisent au niveau de l'exon 1α ou de l'exon 2, il a été observé que des mutations peuvent toucher l'exon 1β donnant ainsi une mutation exclusive du gène *ARF* au niveau du locus *CDKN2A* [57].

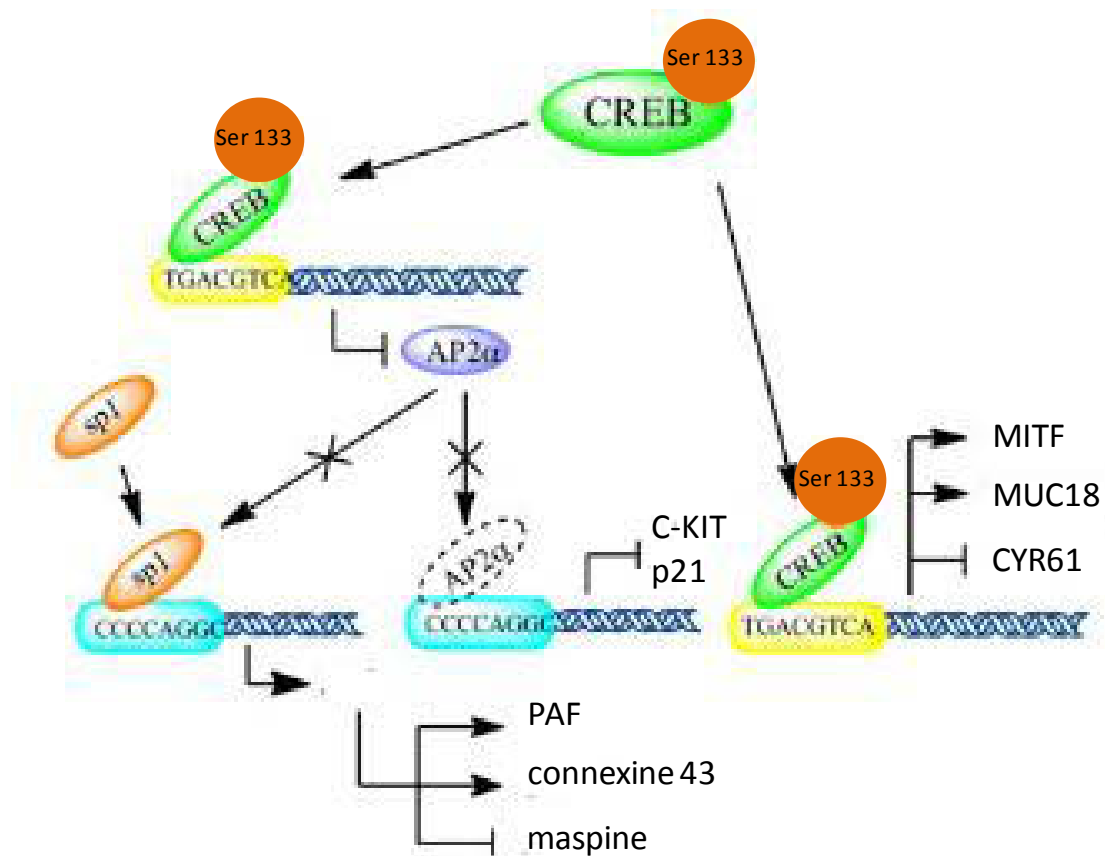
## **V- Les facteurs de transcription**

La dérégulation des facteurs de transcription et de leurs gènes cibles durant la transition de la phase RGP à la phase VGP peut favoriser l'apparition du phénotype métastatique du mélanome. Le rôle des facteurs de transcription AP-2, CREB, ATF2, Snail, NFκB, STAT et MITF va être développé ci-après.

### **1) AP-2 et CREB**

La progression du mélanome cutané est associée à la perte de l'expression du facteur de transcription AP-2 (activating Protein 2) [68-70]. Ce facteur de transcription orchestre une variété de processus cellulaires comme l'apoptose, la croissance cellulaire et la différenciation pendant l'embryogenèse [71]. Il a été démontré qu'AP-2 agit comme facteur suppresseur de tumeur en activant l'expression de p21WAF1/CIP1 induisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire [72]. Il est aussi partenaire du facteur suppresseur de tumeur p53 en stimulant l'activité transcriptionnelle de ce dernier [73]. Dans les cellules métastatiques de mélanome, la perte d'AP-2 est directement liée à la surexpression de MCAM/MUC18 (melanoma cell adhesion molecule), de PAR1 (protease-activated receptor-1), de MMP2 (matrix metalloproteinase-2) et de VEGF. Cela a été expliqué par l'entrée en compétition d'AP-2 avec les facteurs de transcription respectifs de ces gènes [72].

Une forte corrélation inverse entre la perte d'AP2 et la surexpression de CREB (cAMP-responsive element (CRE)-binding protein) a été observée lors de la propagation du mélanome. Cela a été expliqué par la liaison de CREB à la région promotrice d'*AP2* et par l'inhibition de sa transcription pendant la transition vers un phénotype métastatique [74]. En inhibant AP2, CREB induit donc l'expression de MUC18, MMP2 et VEGF. De plus, ce facteur de transcription, suite à une phosphorylation au niveau de son résidu serine 131, peut interagir directement avec le promoteur des gènes de MITF et MUC18 pour augmenter leur



**Figure 15: Cibles géniques régulées par CREB et AP2 $\alpha$**

Lors du passage de la phase RGP à la phase VGP, CREB est activé suite à sa phosphorylation au niveau de la sérine 133. L'activation de CREB réduit l'expression d'AP2 $\alpha$ , affectant ainsi les gènes régulés par celui-ci. La suppression d'AP2 $\alpha$  permet l'expression de promoteurs de tumeur comme PAF et connexine 43 et réduit l'expression de suppresseurs de tumeur comme la mapsine. CREB joue aussi le rôle de facteur de transcription et permet de contrôler l'expression de MCAM/MUC18, MITF et CYR61.

Moble 2012<sup>(72)</sup>

expression et CYR61, un suppresseur de tumeur, pour l'inhiber [75] (**Figure 15**). Cela suggère l'existence d'un équilibre, entre l'expression d'AP-2 et de CREB, équilibre crucial pour la progression du mélanome en permettant le passage d'un phénotype RGP à un phénotype VGP [76].

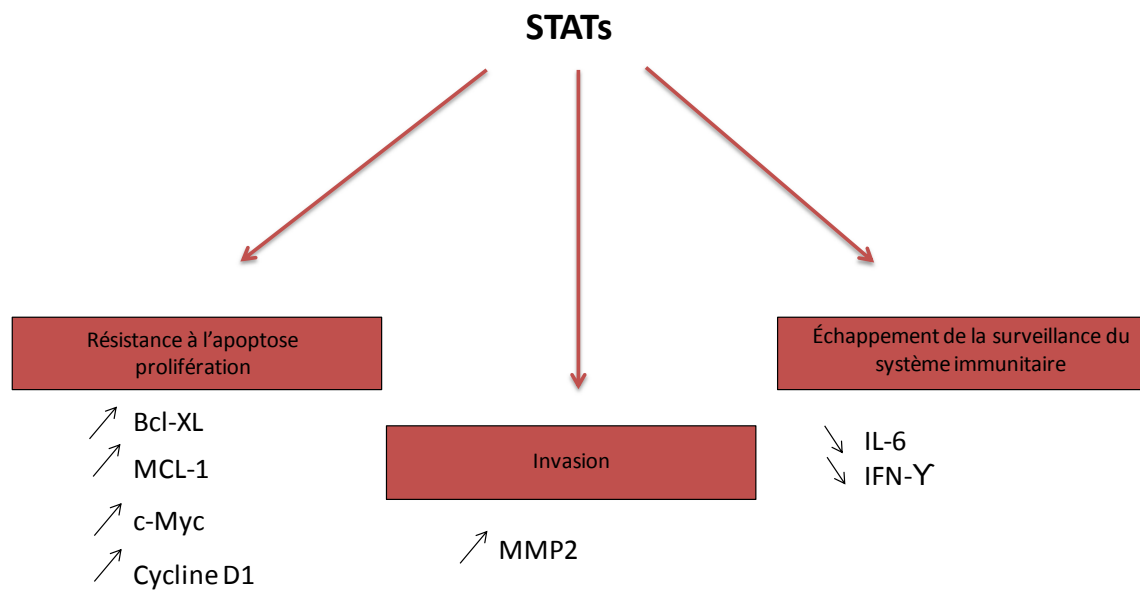
## 2) ATF2

ATF2 (activating transcription factor 2) est un facteur de transcription qui fait partie de la famille CREB/ATF. Il peut former des hétérodimères avec des facteurs de transcription des familles Jun, Fos ou Maf pour réguler différentes fonctions cellulaires comme le développement embryonnaire, la réponse au stress, la mort cellulaire mais aussi le développement des pathologies [77]. Bien qu'aucune mutation n'ait été observée dans le gène *ATF2*, l'altération de son expression et/ou de son activité a été associée au développement des cancers et plus particulièrement au mélanome [78, 79]. En plus de son rôle d'oncogène, ATF2 peut jouer le rôle de suppresseur de tumeur [80]. En effet, il a été montré que l'inactivation du gène *ATF2* empêche le développement du mélanome dans le modèle de souris génétiquement modifié *N-Ras/Ink4a*<sup>-/-</sup> [78] mais en même temps elle permet l'augmentation de l'incidence des papillomes et des tumeurs mammaires [81, 82]. Ce double rôle entraînant des effets opposés d'ATF2 dépendrait de sa localisation subcellulaire. ATF2 est localisé au niveau cytoplasmique dans les tumeurs dans lesquelles il joue le rôle de suppresseur de tumeur [81]. Cependant, il est essentiellement nucléaire dans le mélanome, là où il est associé à un mauvais pronostic chez les patients [79, 83]. La localisation nucléaire d'ATF2 est conditionnée par sa phosphorylation sur la thréonine 52 par la PKC $\epsilon$  [84]. La perte de cette phosphorylation, comme observée dans les lignées tumorales peu agressives, est requise pour le transport d'ATF2 depuis le noyau jusqu'à la mitochondrie où il provoque l'apoptose et donc joue son rôle suppresseur de tumeur. Cependant, le taux élevé de PKC $\epsilon$  retrouvé dans les mélanomes métastatiques, empêche la translocation d'ATF2 vers la mitochondrie et cette absence d'ATF2 au niveau mitochondrial va inhiber l'apoptose et donc favoriser la survie des cellules tumorales [84].

## 3) Snail

Les facteurs de transcription de la famille Snail ont été associés à la TEM pendant le développement embryonnaire et aux processus de métastases en inhibant des effecteurs de la TEM. Les protéines de cette famille, Snail (Snail1), Slug (Snail2) et Smuc (Snail3) sont des





**Figure 16: Implication des STATs dans la propagation du mélanome cutané**

Les STATs participent à la propagation du mélanome en induisant la prolifération et la résistance à l'apoptose, en stimulant l'invasion et en réprimant la surveillance par le système immunitaire

protéines à doigt de zinc. Les facteurs de transcription Snail ont au niveau de leur extrémité N-terminale un domaine SNAG qui est responsable de leur rôle suppresseur. Par exemple, le domaine SNAG du facteur de transcription Slug interagit avec CtBP-1 qui va recruter une histone déacétylase pour réprimer l'expression du gène cible (85).

Il a été démontré que la surexpression de ces facteurs de transcription induit la transition RGP-VGP dans différentes lignées cellulaires de mélanome, plus particulièrement en réprimant l'expression de la E-cadhérine qui assure la liaison entre les mélanocytes et les kératinocytes dans l'épiderme (voir paragraphe 6, molécules d'adhésion) (86). Slug est aussi une molécule de survie qui permet la résistance à l'apoptose dans des lignées de mélanome (87). De plus, Slug peut d'une part interagir avec p53 pour réprimer son rôle pro-apoptotique (88), d'autre part, il collabore avec différents oncogènes pour permettre la dissémination du mélanome (89).

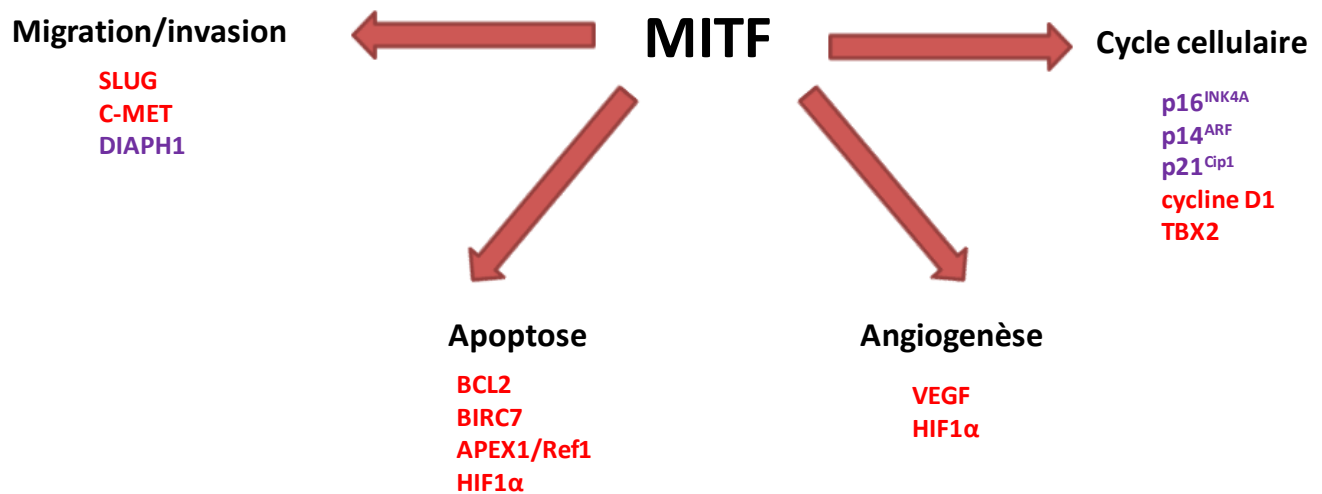
#### 4) NFκB

NFκB (nuclear factor kappa B) est impliqué dans plusieurs processus cellulaires comme l'inflammation, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et l'oncogenèse. L'activation constitutive de ce facteur de transcription a été reportée dans un grand nombre de tumeurs solides et cette activation entraîne la survie cellulaire et réduit la sensibilité à la chimiothérapie. Les mélanocytes et les lignées de mélanomes non métastatiques montrent une faible activité, voir une absence de NFκB, contrairement aux lignées hautement métastatiques qui montrent une forte activité (71).

La surexpression de NFκB a été associée à l'activité constitutive de la kinase AKT dont le rôle dans la propagation du mélanome a été bien étudié (90). Par contre, l'inhibition de NFκB dans des lignées de mélanome est associée à une diminution du taux de VEGF, MMP2, MMP9 et IL6 montrant son rôle important dans la dissémination et l'angiogenèse du mélanome (91, 92).

#### 5) Les STATs

La famille des STATs (signal transducers and activators of transcription) compte 6 facteurs de transcription dont l'activation se produit au niveau du cytoplasme en réponse à divers stimuli. STAT3 et STAT5 répondent à des stimulations oncogéniques par les facteurs de croissance (EGF, TGFβ, HGF et IL-6) ou par les tyrosines kinases (Src, Lyn ou Lck). STAT3 et STAT5 sont souvent activés dans les tumeurs et en particulier dans le mélanome (71). L'activation



**Figure 17: Cibles géniques de MITF**

Elles permettent la propagation (rouge) ou la suppression du mélanome (violet).

contrôle immunitaire (**Figure 16**). Ainsi, il a été démontré dans le mélanome que l'activation de STAT3 est associée à l'expression de gènes anti apoptotiques comme Bcl-XL et MCL-1 aussi bien que de gènes favorisant la prolifération comme c-Myc et la cycline D1 [14]. De plus, dans les processus d'invasion et de métastase, il a aussi été démontré que STAT3 peut agir directement sur le promoteur de MMP2 et stimuler son expression [93]. Une autre étude a montré une amélioration de l'efficacité des effecteurs du système immunitaire (cellules dendritiques et lymphocytes T CD8) lors de l'inhibition de STAT3 dans des lignées de mélanome. Cela montre l'importance de STAT3 dans l'échappement des cellules tumorales du système immunitaire [94].

Enfin, l'implication de STAT3 dans la résistance tumorale au traitement par des inhibiteurs de BRAF a été récemment démontrée. Cette implication suggère de cibler cette protéine en combinaison avec des inhibiteurs de la voie MAPK pour le traitement du mélanome [95].

#### 6) MITF

MITF a un rôle controversé dans le développement et la propagation du mélanome. En effet, il est associé à la sénescence, l'apoptose, la prolifération, la migration/invasion et la différenciation par la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes (**Figure 17**).

Les locus *INK4A/ARF* et *WAF1* codent pour des protéines médiatrices de la sénescence cellulaire, p16<sup>INK4A</sup> et p14<sup>ARF</sup>, et p21<sup>Cip1</sup>. MITF favorise la sénescence cellulaire en se liant directement aux promoteurs de ces gènes et en stimulant leur transcription [96]. Cependant, MITF peut aussi favoriser la prolifération cellulaire en stimulant l'expression de la cycline D1 [97] et TBX2 (T-Box transcription factor 2) [96]. En effet, le nombre de copies du gène *cycline D1*, médiateur du cycle cellulaire, est amplifié dans 25% des mélanomes [98] et *TBX2*, inhibiteur des effecteurs de la sénescence cellulaire p19<sup>ARF</sup> et p21<sup>Cip1</sup>, est retrouvé hautement exprimé dans les tumeurs [99, 100].

De plus, MITF joue un rôle anti apoptotique en stimulant la transcription de BCL2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) [96] et de BIRC7/MLIAP (Baculoviral IAP repeat containing 7/ melanoma inhibitor of apoptosis) [101] qui se trouvent tous les deux surexprimés au niveau du mélanome et qui lui confèrent la résistance aux traitements par chimiothérapie [102-105].

L'activité anti oxydante est importante pour la survie des mélanocytes et pour le développement du mélanome car suite à un stress oxydant, une cellule peut entrer en apoptose. Parmi les protéines qui ont une activité anti oxydante, se trouvent HIF-1 $\alpha$  (hypoxia



inducible factor 1  $\alpha$ ) et APEX1/Ref1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1) dont les gènes sont aussi sous le contrôle de MITF [106, 107].

MITF joue un rôle clé dans l'angiogenèse car il a été observé une diminution de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et de VEGF dans des lignées cellulaires de mélanome lors de l'extinction de ce gène MITF [106].

SLUG, point clé dans la transition épithélio-mésenchymateuse, et c-MET, associé au potentiel métastatique du mélanome, sont sous le contrôle de MITF [108-110] lui donnant ainsi un rôle pro invasif dans le mélanome. Cependant, MITF peut aussi jouer un rôle anti invasif en stimulant la transcription de *DIAPH1* (diaphanous homolog 1). En effet, DIAPH1 inhibe l'invasion cellulaire en stimulant la polymérisation de l'actine [111].

MITF est exprimé dans la majorité des mélanomes et la stabilité de son expression est essentielle pour la survie et la prolifération [112]. De plus, l'amplification du locus *MITF* est observée dans le mélanome métastatique [113]. Néanmoins, l'expression de MITF dans le mélanome reste inférieure à celle des mélanocytes et son augmentation diminue la prolifération cellulaire même en présence de l'oncogène BRAF [114]. Selon son niveau d'expression, MITF pourrait jouer un rôle pro ou anti-tumoral. Un faible taux de MITF stimulerait la prolifération tumorale alors qu'un taux élevé favoriserait la différenciation cellulaire par l'induction de la sénescence et la production de mélanine [115-117]. Par ailleurs, des études ont montré l'existence d'une population de cellules initiatrices de mélanome dont l'existence est requise pour la formation des tumeurs. Cette population peut changer de phénotype et devenir des cellules à fort pouvoir mitotique. Le « switch » entre les deux phénotypes se fait en partie par la modulation de l'expression de MITF [118].

## **VI-Les molécules d'adhésion**

Les molécules d'adhésion jouent un rôle primordial dans les processus physiologiques comme l'intégrité membranaire et l'attachement des leucocytes à l'endothélium. Il existe des molécules de surface qui peuvent établir des interactions homophiliques (entre deux molécules d'adhésion identiques) ou hétérophiliques (entre deux molécules d'adhésion différentes) avec les cellules environnantes. Dans le cas du mélanome et aussi dans d'autres cancers, ces interactions permettent l'agrégation des cellules cancéreuses entre elles ou avec les cellules stromales et les cellules du système circulatoire. Ces interactions contribuent aussi à la migration, l'invasion, la survie pendant la circulation ainsi que l'extravasation dans les parenchymes des organes distants. Les différentes molécules d'adhésion sont classées selon



leurs similitudes structurales et subdivisées en cadhérines, intégrines et immunoglobulines. Chez les patients atteints de mélanome, la surexpression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) et de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  contribuent à la formation de métastases. La perte des E-cadhérines et l'expression des N-cadhérines est à l'origine de la dissociation des cellules tumorales des kératinocytes et induit l'invasion cellulaire. Différentes immunoglobulines comme MCAM/MUC18 et ICAM-1 sont associées à la dissémination du mélanome.

### 1) Les cadhérines

Les cadhérines représentent une large famille de molécules d'adhésion cellulaire calcium dépendantes. Ces molécules établissent préférentiellement des interactions homophiliques. Cette famille inclut les E-cadhérines (de l'épithélium), les P-cadhérines (du placenta) et les N-cadhérines (cadhérines neurales). Dans une peau saine, les interactions entre les kératinocytes et les mélanocytes sont importantes au sein de l'épiderme. Le contrôle de la prolifération des mélanocytes est intimement régulé par les kératinocytes *via* les E-cadhérines. Les domaines extracellulaires de deux molécules d'E-cadhérine sont liés, et les domaines intracellulaires interagissent avec les fibres d'actine du cytosquelette *via* un complexe caténines [119]. Ainsi en liant les réseaux du cytosquelette de deux cellules adjacentes, les E-cadhérines protègent le tissu des forces mécaniques qui peuvent détacher les cellules. Les transformations malignes des mélanocytes sont souvent accompagnées de la perte de l'expression des E-cadhérines [120] qui provoque à son tour la perte de la régulation des mélanocytes par les kératinocytes. La perte de l'expression des E-cadhérines coïncide en général avec l'induction de l'expression des N-cadhérines qui confèrent des nouvelles propriétés adhésives aux cellules. Ces transformations permettent aux mélanocytes de réaliser des contacts avec les fibroblastes et les cellules endothéliales pendant la migration et l'invasion vers le stroma tumoral, le derme, les vaisseaux lymphatiques et sanguins [121]. Les N-cadhérines sont aussi retrouvées au niveau du stroma ce qui explique l'affinité des cellules de mélanome pour ce dernier. Les liaisons entre les N-cadhérines sont plus faible que celles entre les E-cadhérines, ceci est en partie à l'origine de la forte motilité des cellules tumorales par rapport aux mélanocytes normaux. L'une des modifications moléculaires qui peut expliquer le switch du répertoire des E-cadhérines vers les N-cadhérines lors du développement du mélanome, est la surexpression du facteur de transcription SNAIL. En effet, l'activation de SNAIL joue un rôle important dans l'inhibition des E-cadhérines et dans la tumorigénèse [122]. De plus, ce facteur de transcription inhibe l'expression de l'enzyme CYLD. Cette perte va provoquer l'induction du





proto-oncogène BCL-3 qui va être transloqué au niveau nucléaire pour stimuler le promoteur des N-cadhérines (123).

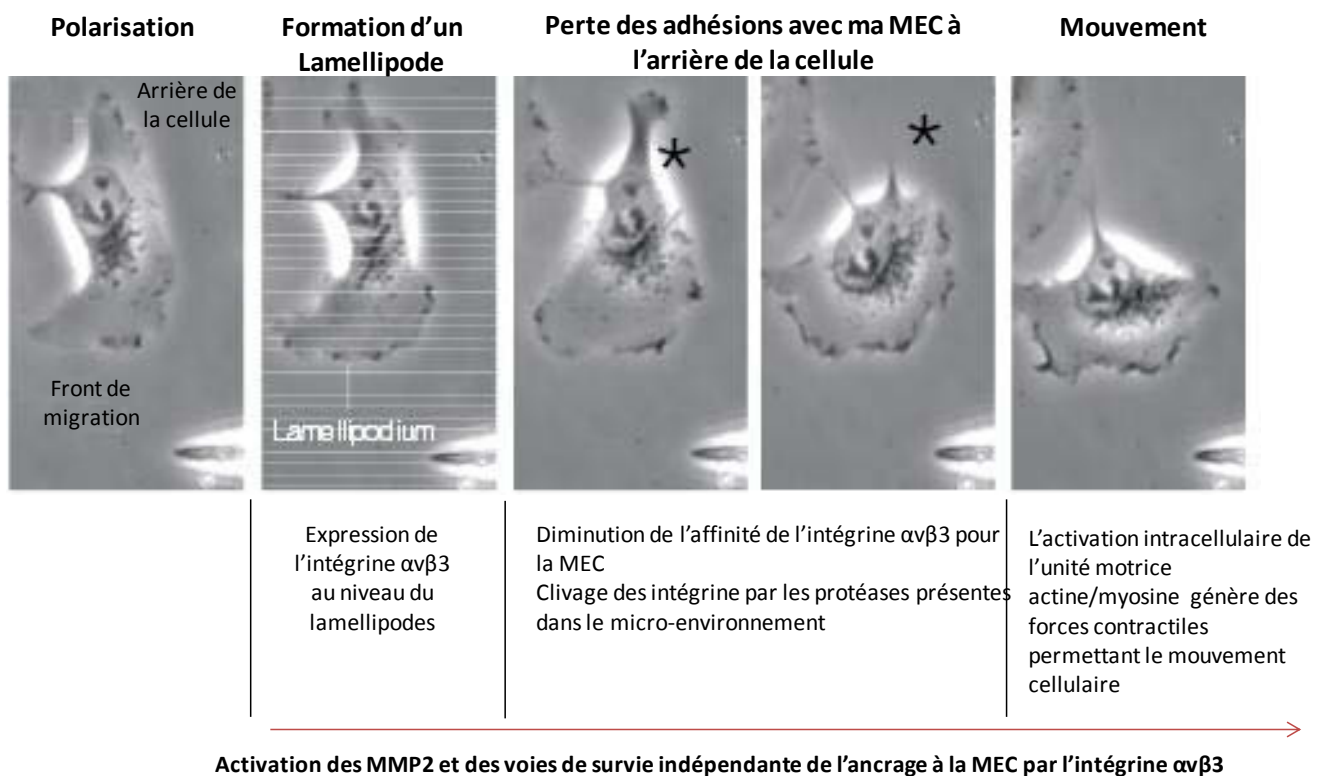
## 2) Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs membranaires hétérodimériques formés par des associations non covalentes entre une chaîne alpha et une chaîne bêta. Les intégrines permettent la réalisation des jonctions intercellulaires et des jonctions entre cellules et MEC de façon calcium dépendante. Actuellement, au moins 9 chaînes  $\beta$  et 20 chaînes  $\alpha$  ont été décrites. La combinaison entre une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  va déterminer la spécificité pour un ligand, et donc un grand nombre de molécules d'adhésion impliquées dans les jonctions cellule-cellule ou cellule-MEC peuvent être exprimées par une cellule donnée. En comparaison avec des lésions bénignes, le mélanome montre une perte d'expression du récepteur à la laminine ( $\alpha 6 \beta 1$ ) (124, 125), une augmentation de l'expression du récepteur  $\alpha 4 \beta 1$  (126, 127), du récepteur de la vitronectine  $\alpha V \beta 3$  et du récepteur à la fibronectine  $\alpha 5 \beta 1$  (127, 128). Ces intégrines semblent avoir un rôle crucial dans le développement et la dissémination du mélanome, car un changement de leur niveau d'expression corrèle avec les paramètres pronostiques de la pathologie. Bien que plusieurs intégrines puissent être associées à l'agressivité tumorale, une attention particulière sera portée aux intégrines  $\alpha 4 \beta 1$ ,  $\alpha V \beta 3$  et  $\alpha 5 \beta 1$  dans les paragraphes ci-dessous.

### a) L'intégrine $\alpha 4 \beta 1$

Les ligands de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  sont la thrombospondine, la fibronectine et VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1). L'adhésion provoquée par l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  des populations lymphocytaires et VCAM-1 des cellules endothéliales activées est la première étape de l'extravasation de ces cellules au niveau du site d'inflammation (129). Il a été montré que l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  est exprimée par les cellules de mélanome et peut permettre à ces dernières de migrer depuis le système vasculaire vers n'importe quel tissu où l'expression de VCAM-1 par l'endothélium est induite, ce qui permettrait de former des lésions métastatiques (130, 131). La modulation de l'expression de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  ou de VCAM-1 a un effet significatif sur le nombre de métastases (132, 133).

Des études ont montré que l'expression de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  est un facteur de mauvais pronostic indépendant qui corrèle avec une plus courte durée de survie globale et sans récurrence (125).



**\*** Perte des contacts avec la MEC

**Figure 18: Implication de l'intégrine  $\alpha\beta 3$  dans l'invasion cellulaire**  
*Hood 2002* <sup>(137)</sup>

#### b) $\alpha V\beta 3$

Les intégrines  $\alpha V\beta 3$  (Récepteur de la vitronectine ) ont été associées dans le mélanome aux processus d'adhésion, de migration, d'invasion, d'activation des métalloprotéases, de survie et d'angiogenèse (134). L'intégrine  $\alpha V\beta 3$  est spécifiquement exprimée dans les cellules endothéliales tumorales ce qui en fait une cible pour le traitement des cancers (135). En effet, le ciblage de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  a fait l'objet de plusieurs études cliniques (136).

Lors du processus d'invasion et de migration, les cellules sont polarisées avec front de migration et arrière de la cellule. A ce niveau les intégrines en général, et  $\alpha V\beta 3$  en particulier jouent un rôle clé (**Figure 18**). En effet, ces intégrines sont exprimées au niveau des lamellipodes afin d'établir de nouveaux points d'attache. Par contre, à l'arrière de la cellule, elles vont d'une part diminuer leur affinité pour la MEC et d'autre part elles sont clivées par des protéases (137). Lors de la TEM, l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  interagit avec les MMP2 afin de les activer pour dégrader la membrane basale et améliorer la migration des cellules tumorales (138-140). Par ailleurs, lors des processus d'invasion, l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  va transmettre des signaux intracellulaires de survie, indépendants de l'ancrage à la MEC, par l'intermédiaire des voies FAK et PI3K (137).

L'expression de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  a été associée à la progression métastatique du mélanome (141). Bien que l'expression de la chaîne  $\alpha V$  soit plus marquée dans le mélanome primitif, le statut en chaîne  $\beta 3$  corrèle avec le passage du phénotype RGP vers un phénotype VGP (127, 128, 142) lui donnant ainsi une valeur pronostique (143-145).

#### c) L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (récepteur de la fibronectine) peut jouer un rôle important dans différents stades de développement du mélanome.

Dans les premiers stades, le « melanoma inhibitory activity » (MIA) est une petite protéine de 11 kDa sécrétée par les cellules de mélanome. Son rôle a été particulièrement associé dans le développement et l'invasion de la tumeur (146). Il a été montré que cette protéine interagit avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , cette interaction provoque l'endocytose de l'intégrine avec son ligand et le détachement de la cellule de mélanome de sa structure environnante, cela augmente le potentiel migratoire et invasif de la cellule tumorale (147).

Le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans l'invasion cellulaire a été démontré dans des lignées murines de mélanome. Suite à l'interaction avec la fibronectine, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  enclenche une



cascade de signalisation intra-cellulaire impliquant FAK, PI3K et ERK, qui va permettre la translocation nucléaire de NF $\kappa$ B et l'expression de MMP9 (148).

Le rôle de cette intégrine a également été démontré dans l'extravasation lors des processus de métastases notamment dans l'adhésion des cellules de mélanome avec l'endothélium exprimant la fibronectine à sa surface (135).

Par comparaison avec l'intégrine  $\alpha$ v $\beta$ 3, l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 joue un rôle plus important dans la croissance tumorale et son expression par les cellules tumorales et les cellules endothéliales est même plus spécifique (149). En effet, une étude récente, dans un modèle préclinique de mélanome, a montré que l'utilisation de liposomes portant à leurs surfaces un antagoniste (le peptide Ac-PHSCN-NH<sub>2</sub>) des intégrines  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 permet la délivrance de la Doxorubicine (chimiothérapie) de façon spécifique. Par ailleurs, dans d'autres modèles précliniques, il a été montré que cet antagoniste cible spécifiquement les vaisseaux sanguins néo-formés sans aucun effet sur la circulation pré-existante (150). Ceci démontre l'implication de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 dans les processus d'angiogenèse tumorale.

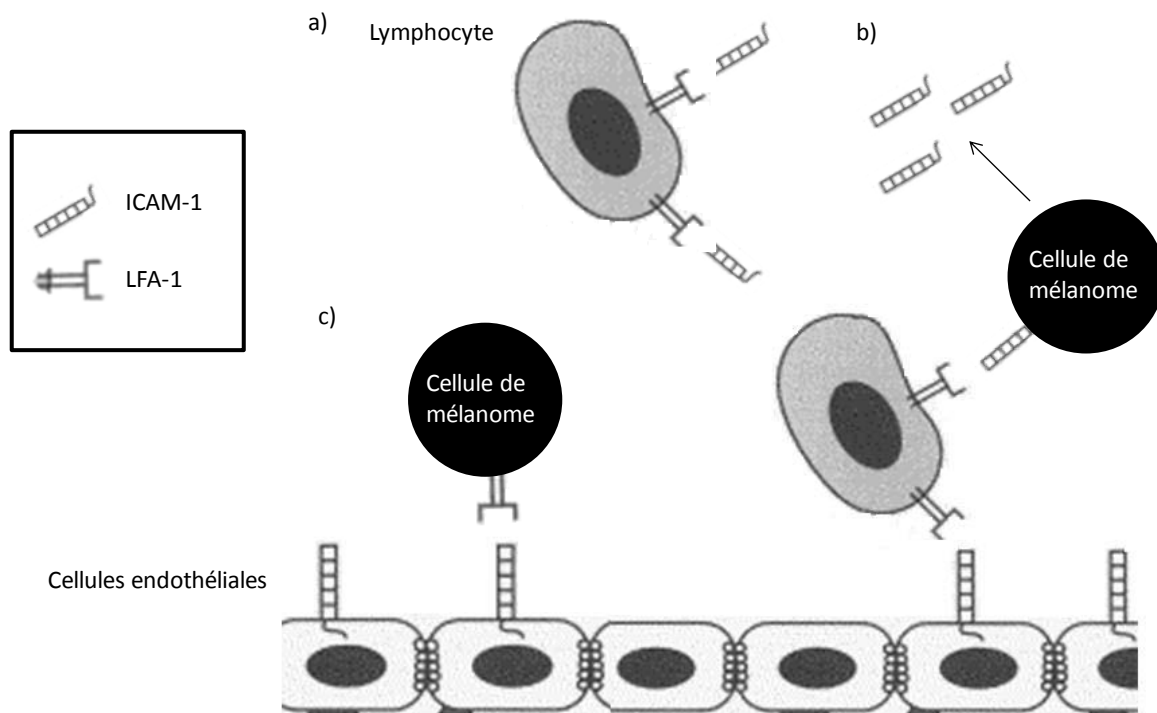
### 3) Les immunoglobulines

#### a) MCAM/MUC18

MCAM/MUC18 est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Dans le mélanome, cette glycoprotéine est impliquée dans le « switch » de la phase RGD vers la phase VGP. En effet, les MCAM/MUC18 établissent des adhésions homotopiques entre les cellules de mélanome, et hétérotopiques entre les cellules de mélanome et les cellules endothéliales (72). Il a été observé *in vivo* que le taux d'expression de MCAM/MUC18 du mélanome primitif corrèle directement avec la progression tumorale et l'acquisition d'un phénotype métastatique (151-153). De plus, la surexpression de MCAM dans des lignées de mélanome ne l'exprimant pas, rend ces dernières hautement prolifératives et métastatiques (154). Ce phénotype métastatique est expliqué au moins en partie par l'induction d'Id 1 (inhibitor of DNA binding-1) et l'inhibition du facteur de transcription ATF-3 pour permettre l'activation des MMP2 et induire l'invasion cellulaire (155).

#### b) ICAM-1

Il a été observé que l'expression d'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) est plus importante dans les lésions malignes que dans les lésions bénignes. De plus, l'expression d'ICAM-1 corrèle avec l'épaisseur de la tumeur primitive (144, 156) donnant ainsi une valeur pronostique à ce marqueur. En effet, les patients porteurs de mélanome de stade 1 positifs



### Figure 19: Implication d'ICAM1 dans l'extravasation

Les cellules de mélanome sont capables de sécréter ICAM-1. Cette forme sécrétée permet d'inhiber la phagocytose des cellules de mélanome par les leucocytes (a). Dans la circulation sanguine, l'interaction entre les LFA-1 des leucocytes et les ICAM1 des cellules tumorales permet d'améliorer la survie de ces dernières dans le système vasculaire et de faciliter le processus d'extravasation (b). L'expression d'ICAM1 et de LFA-1 par les cellules endothéliales et les cellules de mélanome améliore le processus d'extravasation (c).

pour ICAM-1 ont une survie globale significativement plus courte et sans récurrence en comparaison aux patients négatifs pour ce marqueur (144). L'interaction d'ICAM-1 exprimé par la cellule cible et de l'intégrine  $\beta 2$  (LFA-1) du lymphocyte T est nécessaire pour la reconnaissance et l'interaction optimale entre ces deux cellules. Deux mécanismes sont proposés pour le rôle d'ICAM-1 dans la survie et la dissémination du mélanome :

- Le premier mécanisme s'appuie sur le fait que les cellules de mélanome sont capables de sécréter ICAM-1. Cette forme sécrétée permet d'inhiber l'interaction entre les lymphocytes et les cellules de mélanome (157) ce qui contribue à la survie tumorale (158) (**Figure 19a**).
- Le deuxième mécanisme met en jeu l'interaction entre les polynucléaires neutrophiles (LFA-1) et les cellules tumorales (ICAM-1). Cette interaction permet d'améliorer la survie de ces dernières dans le système vasculaire et de faciliter le processus d'extravasation (159) (**Figure 19b**).

Une autre étude a montré l'existence d'un dialogue croisé entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales. La co-culture de ces deux lignées induit respectivement l'expression d'ICAM1 et de LFA-1 par les cellules endothéliales et les cellules de mélanome, et améliore le processus d'extravasation (160) (**Figure 19c**).

## **VII- Les protéases**

Le microenvironnement tumoral est formé d'une MEC extrêmement modifiée et de différents types cellulaires. Durant la progression tumorale, le microenvironnement est caractérisé par une hypoxie, une acidose et une privation de nutriments. Tous ces paramètres induisent la sécrétion de protéases par les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement. Les protéases sécrétées vont permettre de dégrader les composants de la MEC mais aussi des molécules présentes à la surface des cellules. Cela va permettre, d'une part, l'invasion et le franchissement de la membrane basale, d'autre part, la libération de facteurs de croissance et angiogéniques qui se trouvent au niveau de la MEC. Parmi les principales protéases impliquées dans la progression tumorale, nous pouvons citer les métallo-protéases matricielles (MMPs), les cathepsines (161), les ADAMs (162) et le système d'activation du plasminogène. Dans le cas du mélanome, l'urokinase plasminogen activator (uPA) joue un rôle clé dans l'invasion cellulaire et la formation de métastases. L'uPA convertit le plasminogène en plasmine qui à son tour dégrade une large variété des molécules de la MEC et permet aux



a)

Gélatinases: MMP2, MMP9



Collagénases: MMP1, MMP8, MMP13, MMP18

Stromélysines: MMP3, MMP10

Métalloélastase: MMP12

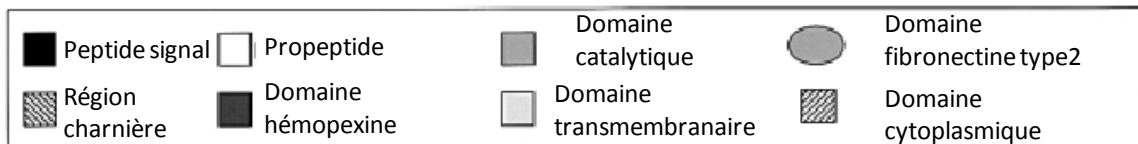
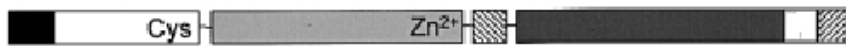
Autres :MMP11, MMP19, MMP20



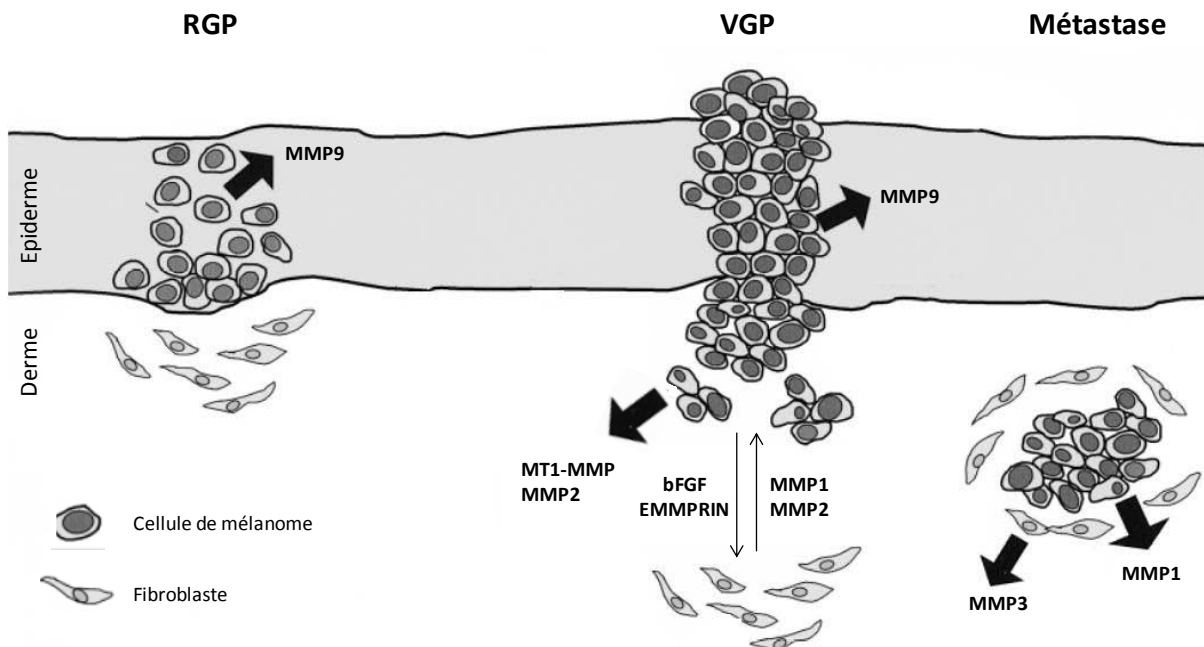
Matrilysine: MMP7



Métalloprotéase type membranaire: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP, MT6-MMP



b)



**Figure 20: Profil des MMPs durant les phases de développement du mélanome**

a) Structure des MMPs. B) Chaque phase de développement du mélanome est caractérisée par l'expression de MMPs spécifiques. MMP9 pendant la phase RGP, MMP2 et MT1-MMP pendant la phase VGP et MMP3 et MMP1 pendant la formation de métastases.

Hofmann 2000 <sup>(165)</sup>

cellules tumorales de traverser la membrane basale (163). Par ailleurs, uPA, en se fixant sur son récepteur (uPAR), module l'invasion, la prolifération et la migration cellulaire (164).

Les MMPs constituent une famille de protéase très étudiée dans la progression du mélanome cutané. Les MMPs sont des métallo-protéases dépendantes du zinc capables de dégrader les composantes de la MEC. Les MMPs sont classifiées selon le substrat qu'elles digèrent préférentiellement. Certaines MMPs sont ainsi appelées des collagénases, stromélysines, gélatinases, etc. En général, les MMPs contiennent un peptide signal, un propeptide N-terminal, un domaine catalytique contenant le site de fixation du zinc, une région charnière et un domaine C-terminal de type hémopexine. Les gélatinases MMP2 et MMP9 possèdent un domaine fibronectine de type II supplémentaire. Les six MMPs de type membranaire (de MT1-MMP à MT6-MMP) ont un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. La MMP7 est plus petite que les autres MMPs car elle est dépourvue du domaine hémopexine et de la région charnière (**Figure 20a**) (165).

Le fonctionnement des MMPs dépend d'un équilibre dynamique MMPs - TIMPs (inhibiteurs de métallo-protéases tissulaires) (165). Selon les concentrations et le microenvironnement, l'inhibition des TIMP peut inhiber ou stimuler l'activité de la MMP correspondante. Vingt quatre MMPs humaines ont été identifiées à ce jour. Leur forte activité dans les cancers a souvent été corrélée à des mauvais pronostics.

La plupart des étapes de dissémination du mélanome (transition RGP-VGP, invasion, extravasation...) requière la production de MMPs, aussi bien par la tumeur que par le stroma (fibroblastes et cellules du système immunitaire). La sécrétion de ces MMPs est à l'origine d'une partie des dialogues croisés entre les cellules tumorales et leur microenvironnement (**Figure 20b**). Ainsi, la MMP3 produite par les fibroblastes du derme est capable de stimuler l'expression de MMP1 par les cellules de mélanome et ainsi augmenter leur pouvoir invasif. Dans le même contexte, il a été montré que le bFGF produit par les cellules de mélanome peut stimuler la MMP1 des fibroblastes qui à son tour permet l'invasion d'une matrice de collagène de type I par les cellules de mélanome. Par ailleurs, l'EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), produite par des cellules de mélanome, stimule la production de MMP2 par les fibroblastes permettant ainsi l'invasion des cellules de mélanome (166). Dans le mélanome, différentes études ont décrit la gélatinase 2 (MMP2) comme un bon marqueur pronostique (167). De plus, il a été proposé que la détection simultanée de MMP2, Ki67 (marqueur de l'index mitotique) et p53 pourrait être un bon indicateur du risque de récurrence des patients (168). MT1-MMP est très peu exprimée par les



indicateur du risque de récurrence des patients (168). MT1-MMP est très peu exprimée par les mélanocytes, cependant elle est fortement présente dans le front de migration tumoral, particulièrement dans le mélanome.

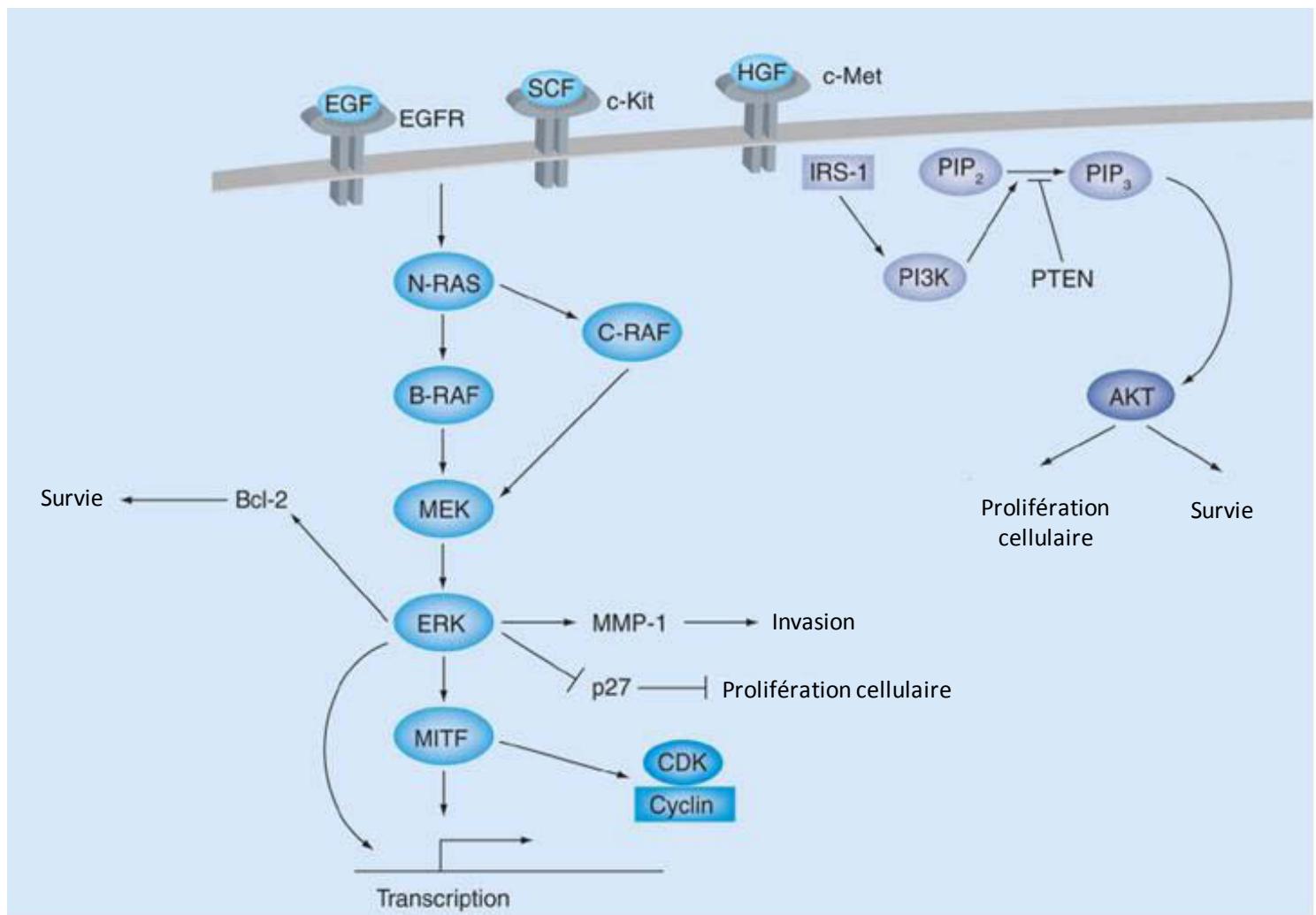
L'activation des MT1-MMPs se fait dans un premier temps par une convertase furine puis par une autotéololyse (169). MT1-MMP peut participer aux processus d'invasion à différents niveaux : avec son activité collagénase elle permet de dégrader directement certains composants de la MEC et indirectement par l'activation des MMP2 ; enfin MT1-MMP permet le clivage de CD44 et l'activation de l'intégrine  $\alpha\text{V}\beta 3$  facilitant ainsi la migration et l'invasion cellulaire (170, 169).

Il a aussi été proposé que le profil d'expression des MMPs dépendrait du stade de propagation du mélanome avec l'association de MMP9 au stade RGP, de MMP2 et MT1-MMP au stade VGP et de MMP1 au développement des métastases (**Figure 20b**) (171).

En plus de son rôle de soutien, la MEC constitue un réservoir de molécules bioactives et sa dégradation par les MMPs permet donc leur biodisponibilité. Parmi ces molécules bioactives nous pouvons citer les facteurs de croissance, les cytokines et les chimiokines (172). Le clivage du TGF- $\beta$  par les MMP2 et 9 génère une molécule active capable d'augmenter la survie des cellules de mélanome et la croissance tumorale (173). Le clivage de CXCL8 par MMP9 permet d'améliorer son pouvoir chemo-attractant vis-à-vis des cellules du système immunitaire (174). Ainsi, les MMPs pourraient contribuer à la fois à l'élaboration d'une réponse anti-tumorale par le recrutement des cellules immunitaires, mais aussi au développement de la tumeur. En effet, CXCL8 est aussi un inducteur puissant de MMP2 dans les cellules tumorales (175). Le remodelage et la fragmentation des composés de la MEC par les MMPs sont accompagnés par la libération de petites molécules bioactives appelées matrikines. Ces molécules peuvent moduler positivement ou négativement le pouvoir invasif des cellules tumorales (176, 177). Par exemple, il a été démontré que l'augmentation de l'expression de MMP2 et de MT1-MMP dans le front d'invasion du mélanome corrèle avec la dégradation de l'élastine. Les matrikines générées (elastokines) stimulent l'expression des MMP2 créant ainsi un rétrocontrôle positif favorisant la propagation du mélanome (171).

### **VIII- Les récepteurs membranaires**

Les marqueurs de surface ont été largement étudiés dans les cancers. Plusieurs de ces marqueurs ont été décrits dans le but de comprendre leur implication dans la cancérogenèse et de les employer dans des stratégies diagnostiques et thérapeutiques. Dans la partie suivante,



**Figure 21: Voies de signalisations contrôlées par EGFR, c-KIT et c-MET**

Ces récepteurs participent au contrôle des voies MAPK et PI3K. La dérégulation de l'un de ces récepteurs lors d'un mélanome peut être à l'origine de l'hyperactivité de ces voies.

*Ghosh 2009* <sup>(179)</sup>

certaines des récepteurs à activité tyrosine kinase et des récepteurs couplés aux protéines G sont décrits.

### 1) Récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont largement dérégulés dans différents cancers. Dans le mélanome, les altérations des récepteurs EGFR, c-MET et c-KIT résultent de changements dans les voies de signalisation auxquelles ils sont associés (**Figure 21**).

#### a) EGFR

EGFR peut être activé par EGF, TGF- $\alpha$ , amphiréguline et heparin-binding EGF. La fixation de l'un de ces ligands peut enclencher la cascade de signalisation de la voie MAPK et PI3K (178). Le gène d'EGFR est localisé sur le chromosome 7 dont le nombre de copies est amplifié dans les stades tardifs du mélanome. Aucune mutation du gène EGFR n'a été observée, ce qui laisse supposer que ce gène ne serait pas une cible des mutations qui sont à l'origine du développement du mélanome. Mais il faut noter que le séquençage de ce gène n'a pas été réalisé sur un grand nombre d'échantillons (179). Dans le mélanome, l'activation d'EGFR par EGF, induit RAS qui en réponse stimule la sécrétion des ligands d'EGFR. Ceci est à l'origine d'une boucle d'activation permettant une stimulation en continu d'EGFR qui est à l'origine de l'émission de signaux de survie par l'induction de PI3K et AKT (179). De la même façon, l'inhibition d'EGFR atténue la tumorigénicité induite par RAS dans les cellules de mélanome (180). Etant donné qu'aucun inhibiteur efficace de RAS n'a été développé (181), EGFR pourrait être une cible pour le traitement du mélanome dans lequel RAS joue un rôle clé dans la tumorigénicité.

#### b) Kit

Kit est un récepteur à activité tyrosine kinase qui est muté dans le mélanome lentigineux acral (11%), le mélanome muqueux (21%) et le mélanome lié à des expositions chroniques au soleil (17%) (182). Parmi ces récepteurs, c-Kit, récepteur de SCF (stem cell factor), a été particulièrement étudié dans le mélanome. Il a été montré que l'activation de ce récepteur stimule la migration et la prolifération des mélanocytes par la stimulation de la voie MAPK et de la voie PI3K. Par ailleurs, d'autres études ont montré que les mutations activatrices de Kit sont retrouvées dans les mélanomes non mutés pour RAS et RAF suggérant que l'activation constitutive de c-Kit peut égaler l'activation constitutive de RAS ou RAF pour la stimulation de l'axe RAS-RAF-MEK-ERK (49, 183, 184).



c) C-MET

Le récepteur c-Met est synthétisé dans les cellules épithéliales et est important dans le développement embryonnaire et dans les processus de cicatrisation. Les cellules de mélanome ont également la capacité d'exprimer ce récepteur qui permet de stimuler la croissance et l'invasion des cellules tumorales. Le ligand naturel de ces récepteurs est l'HGF qui est aussi produit par les cellules de mélanome et qui permet de stimuler en continu c-MET de façon autocrine et paracrine. L'activation de ce récepteur induit l'activation des voies MAPK et PI3K (185). Son gène comme celui d'EGFR étant localisé au niveau du chromosome 7, le nombre de copies de c-MET est amplifié pendant les phases tardives du mélanome. Plusieurs données ont démontré le rôle clé de c-MET dans la propagation du mélanome. Ainsi, il a été observé que l'expression de c-MET est augmentée au niveau des mélanomes métastatiques (179). De plus, l'expression de ce récepteur au niveau des mélanocytes conduit à l'apparition d'un phénotype métastatique plutôt qu'un phénotype de mélanome primitif. Par ailleurs, la surexpression de ce récepteur au niveau des cellules de mélanome conduit à l'augmentation du nombre de métastases dans un modèle syngénique (179). L'inhibition de son expression dans des cellules de mélanome conduit à la diminution du pouvoir invasif de ces dernières (186) et de la capacité à former des métastases *in vivo* (187).

2) Récepteurs couplés aux protéines G

a) PAR1

Le récepteur PAR1 joue un rôle central dans la cancérogenèse et les phénomènes de dissémination. Son expression est significativement plus importante dans les lésions métastatiques que dans les tumeurs primitives et les nævi dysplasiques (70). L'extinction de ce récepteur dans des lignées de mélanome humain provoque une diminution de la croissance tumorale et une diminution du nombre de métastases dans un modèle de xénogreffe (188). Cependant, la surexpression de ce récepteur augmente de 40% le nombre de métastases dans un modèle syngénique (189). Des études mécanistiques ont montré au niveau moléculaire, l'implication de PAR1 dans la propagation tumorale. L'activation du récepteur PAR1 par une sérine protéase, la thrombine présente dans la circulation et dans les sites tumoraux, est à l'origine de plusieurs réponses cellulaires comme l'activation de la voie MAPK (RAS) et la voie PI3-K qui sont impliquées dans la croissance cellulaire, la propagation tumorale et la cancérogenèse (72). L'activation de PAR1 induit l'expression de gènes comme l'intégrine





$\alpha V\beta 3$ , MMP2, uPA, PDGF (platelet derived growth factor), IL8, VEGF et bFGF requis pour l'adhésion cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse (72).

b) Les FPRs

Les récepteurs aux peptides formylés (FPRs) sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les 3 FPRs humains (FPR1, FPR2/ALX et FPR3) présentent une grande homologie de séquence et lient plusieurs groupes de ligands structurellement différents. Ces récepteurs ont été initialement identifiés dans les leucocytes. Ils peuvent se lier aux peptides N-formylés et non formylés qui chemoattractent et activent les phagocytes. Les peptides N-formylés, qui sont uniquement codés par les bactéries et par le génome mitochondrial, et l'annexine A1 sont les seuls ligands communs des trois récepteurs de cette famille (190) (191). Ces récepteur jouent un rôle primordial dans l'inflammation, en particulier dans les processus d'extravasation et la migration des cellules vers le site d'infection (192). D'autres études ont montré leur présence dans des lignées cancéreuses et leur implication dans la progression tumorale (193). Dans le mélanome, il a été démontré, *in vitro*, que ces récepteurs sont impliqués dans les processus d'invasion (194). *In vivo*, il a été montré que l'expression des FPRs dans la tumeur primitive corrèle avec la progression tumorale (195).



## **Traitement du mélanome**

Lors de la suspicion d'un mélanome, l'exérèse chirurgicale, pratiquée en deux temps, est le seul traitement curatif pour les mélanomes au stade local. Après exérèse complète de la lésion, un examen anatomopathologique est réalisé afin d'affirmer ou d'infirmer le diagnostic. En cas de confirmation de mélanome, cet examen permet d'apporter des éléments pronostiques (indice de Breslow fiable car mesuré sur la totalité de la tumeur, présence ou non d'ulcération, degré d'invasion selon Clark et Mihm), et une reprise d'exérèse sera réalisée le plus précocement possible après la première en respectant une « marge de sécurité » selon la valeur de l'indice de Breslow (196).

Pour les lésions profondes avec un indice de Breslow élevé, il est souvent pratiqué une exérèse du ganglion sentinelle afin de l'analyser en anatomopathologie et de définir s'il y a atteinte ganglionnaire. Si c'est le cas, le chirurgien pratique un curage ganglionnaire total dans la zone de drainage du mélanome. Dans le cas où des métastases sont détectées après examen clinique et/ou par imagerie, la chirurgie est la solution première proposée car la plus efficace. Lorsque les métastases sont inaccessibles ou trop nombreuses, d'autres thérapies sont proposées mais restent toujours moins efficaces que la chirurgie. Dans la partie suivante, différentes stratégies thérapeutiques du mélanome métastatique seront décrites.

### **I- La chimiothérapie**

Bien que plusieurs agents de chimiothérapie aient été testés en clinique (197), jusqu'à récemment, la dacarbazine a été le traitement de référence pour les patients avec un mélanome métastatique (stade IV). La dacarbazine est un agent cytostatique avec des propriétés alkylantes qui inhibent la synthèse de l'ADN et provoque un arrêt du cycle cellulaire. Lorsqu'elle est injectée en intra veineuse, la dacarbazine est clivée au niveau hépatique pour la libération du composé actif, le (3-méthyl-1-triazéno) imadazole-4-carboxamide (MTIC). Bien qu'une réponse complète soit occasionnellement observée, les essais cliniques ont montré des taux de réponse faibles allant de 5 jusqu'à 15% (198). Un autre agent administré par voie orale, le Temozolomide (TMZ), dont la molécule active est le MTIC a été développé. Cette molécule a pour avantages qu'elle ne requiert pas de clivage au niveau hépatique et qu'elle a la capacité de traverser la barrière hémato encéphalique. Son utilisation pour le



traitement des métastases cérébrales a été envisagée, mais les essais cliniques ont montré un faible effet sur ce type de lésions (199). Il était donc évident que des stratégies alternatives devaient être développées pour améliorer la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique.

## **II- L'immunothérapie**

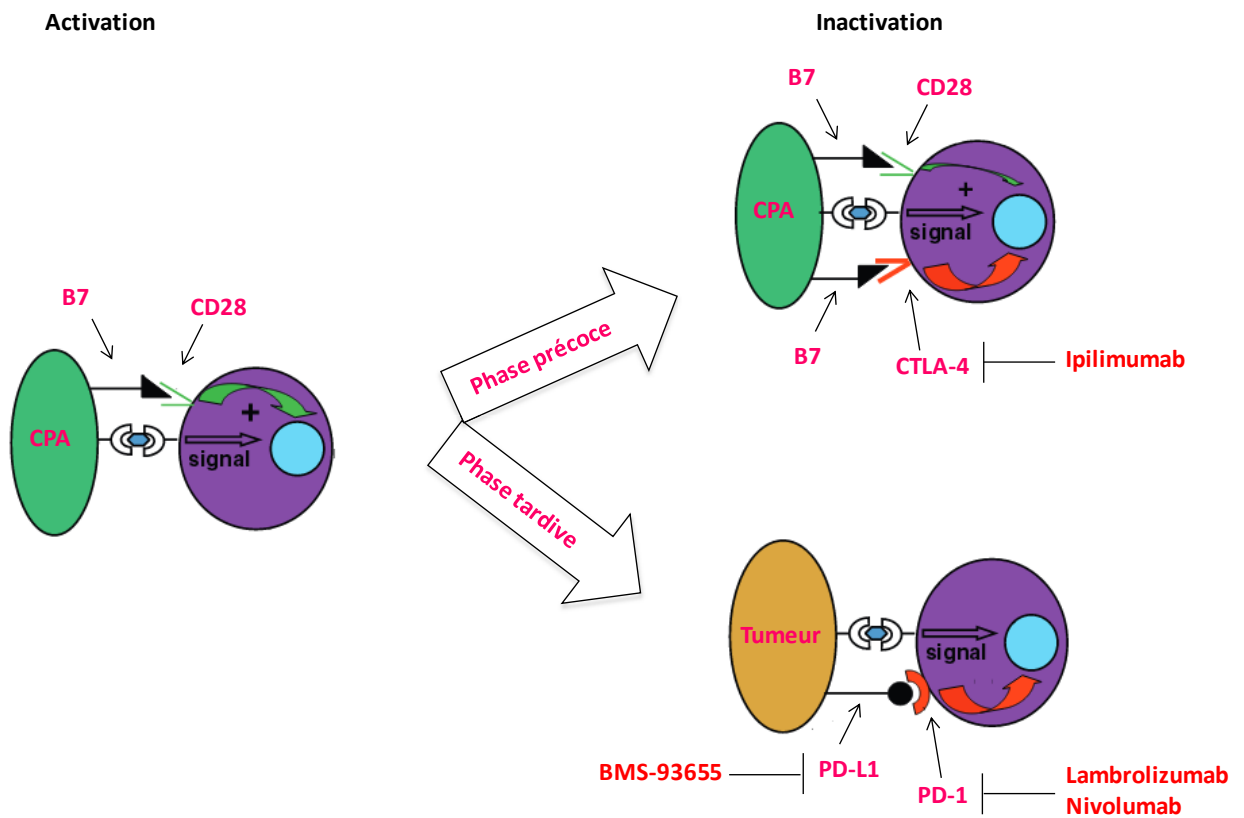
La compréhension de la biologie des phénomènes de cancérogenèse et de l'immunité sont à l'origine du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques qui ont montré une efficacité et des taux de réponses significatifs. L'identification des acteurs de modulation du système immunitaire est particulièrement intéressante.

Le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle de nombreux cancers. La présence d'une réponse immune adaptative spécifique ciblant un antigène tumoral a été mise en évidence depuis fort longtemps chez les patients. L'immunité tumorale cellulaire implique principalement les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). L'activation des lymphocytes T fait intervenir deux autres types cellulaires, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et les lymphocytes T helper (CD4+) : lorsqu'un antigène tumoral est présenté à la surface d'une CPA, les lymphocytes T helper favorisent l'expansion des lymphocytes T CD8 spécifiques, en sécrétant certaines cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-2. Une réponse de ce type a été mise en évidence dans les mélanomes. En raison de l'immunogénicité du mélanome, l'immunothérapie a très tôt représenté un des axes principaux de recherche dans cette pathologie (200, 201).

Le premier traitement d'immunothérapie étudié a été l'IL-2 à haute dose. Dans une méta-analyse de huit études avec ce traitement, il a été observé un taux de réponse globale de 16%, avec 6% de réponse complète et durable. Cependant, ce traitement était associé à une morbidité importante, le rendant difficilement utilisable en pratique clinique (202).

Le transfert adoptif est aussi une approche très prometteuse. Des lymphocytes T sont prélevés soit dans le sang, soit directement dans la tumeur. Ces lymphocytes sont amplifiés et réinjectés après une chimiothérapie lymphodéplétante (203) permettant une meilleure réexpansion du greffon.

Par ailleurs, le décryptage des processus de régulation des lymphocytes T et le ciblage des points clé de ces phénomènes ont montré des résultats intéressants dans le traitement du mélanome. Les lymphocytes T présentent à leur surface différents récepteurs qui interagissent avec les CPA. Selon les acteurs mis en jeu lors de ces interactions, il va y avoir une activation



**Figure 22: Mélanome cutané et immunothérapie**

Schéma de l'inactivation des lymphocytes T pendant les deux phases de la réponse immunitaire et Cibles des anticorps utilisés pour le traitement du mélanome.

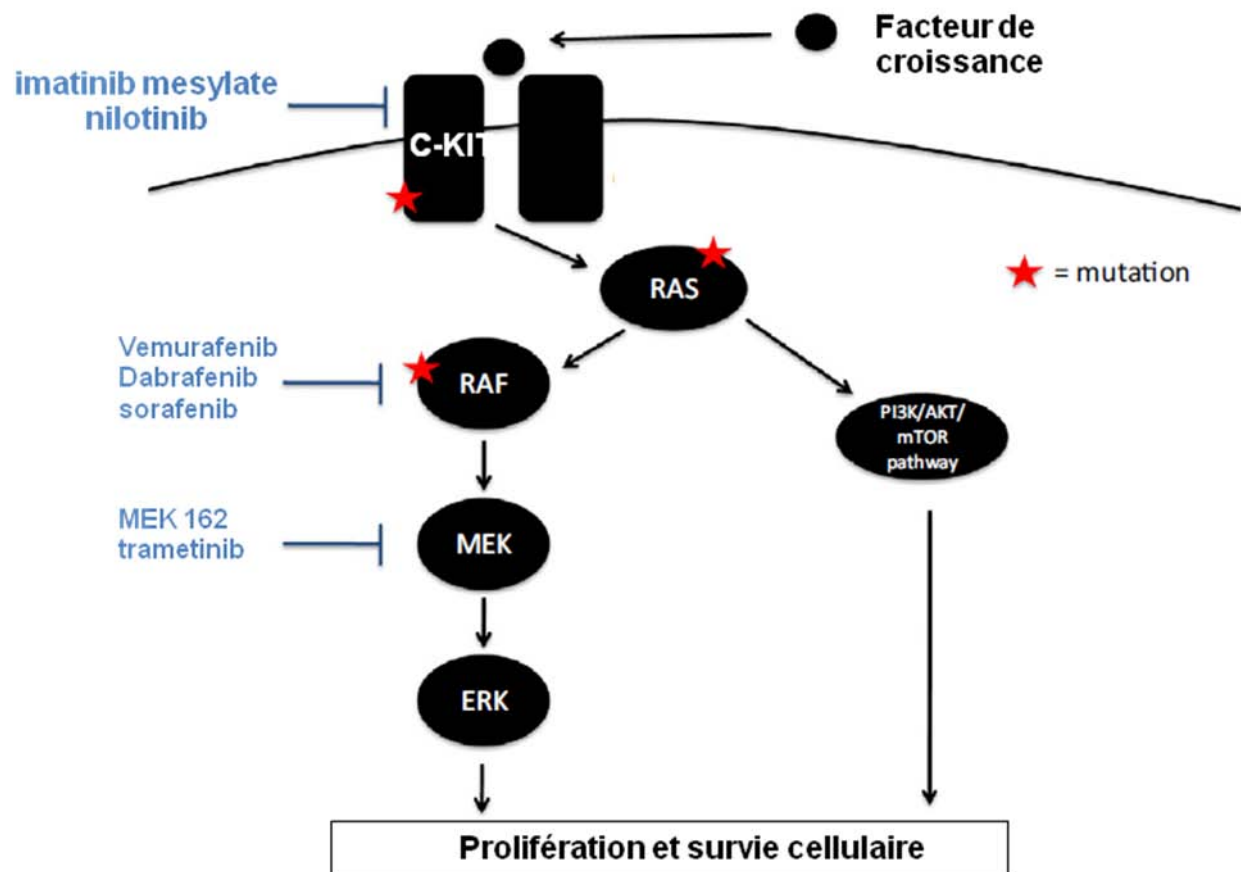
*Topalian 2012* <sup>(204)</sup>

ou une inhibition des lymphocytes T *via* un processus appelé « check point control » (204). Brièvement, les lymphocytes T sont activés d'une part par la présentation d'un antigène aux TCR (T cell receptor) par des CPA et d'autre part, par l'interaction des récepteurs B7 des CPA avec les récepteurs CD28 des Lymphocytes T (**Figure 22**). La stimulation des récepteurs TCR et CD28 est par la suite transmise au niveau nucléaire et enclenche l'activation des lymphocytes T. Pour éviter une réponse auto-immune soutenue et sa propagation, les lymphocytes T sont par la suite inactivés. L'un des processus d'inactivation implique la présence des récepteurs CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) à la surface des lymphocytes T, récepteurs CTLA-4 qui vont entrer en compétition avec CD28 pour interagir avec le récepteur B7 des CPA. Cette interaction se traduit au niveau nucléaire, par un signal inhibiteur des lymphocytes T (**Figure 22**). Un autre processus d'inactivation implique l'expression du récepteur PD-1 (programmed death 1) qui peut interagir avec PD-L1 (programmed death ligand 1) exprimé par le tissu tumoral et inactiver les lymphocytes T (**Figure 22**). CTLA-4 qui interagit avec les CPA, est important dans les phases précoces de la réponse immunitaire alors que PD-1, qui interagit avec le tissu périphérique, est important dans les phases tardives. Les stratégies thérapeutiques décrites ci-après sont basées sur l'inhibition, ou le blocage des « check point control », de CTLA-4, PD-1 ou PD-L1 par des anticorps dans le but de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale (**Figure 22**) (204, 205).

#### 1) Anticorps anti CTLA-4

Le premier anticorps testé est l'Ipilimumab. Des essais cliniques en phase 3 incluant des patients de mélanome avec un stade avancé ont montré que cette thérapie a un taux de réponse relativement faible. En revanche les patients répondeurs ont montré une réponse durable et une médiane de survie plus importante que le groupe contrôle (206, 207). Du fait du mécanisme d'action de l'Ipilimumab, un nouveau profil d'effets secondaires d'ordre immunologique a été mis en évidence, effets secondaires différents de ceux rencontrés avec les chimiothérapies classiques. Il faut noter que lors de ces essais cliniques, 60% des patients ont développé ce type d'effets secondaires touchant principalement la peau, le tube digestif, le foie et l'axe hypothalamohypophysaire.





**Figure 23: Voies de signalisation activées par c-KIT et inhibiteurs associés**  
*Menzies 2013* <sup>(235)</sup>

## 2) Anticorps anti PD-1 et PD-L1

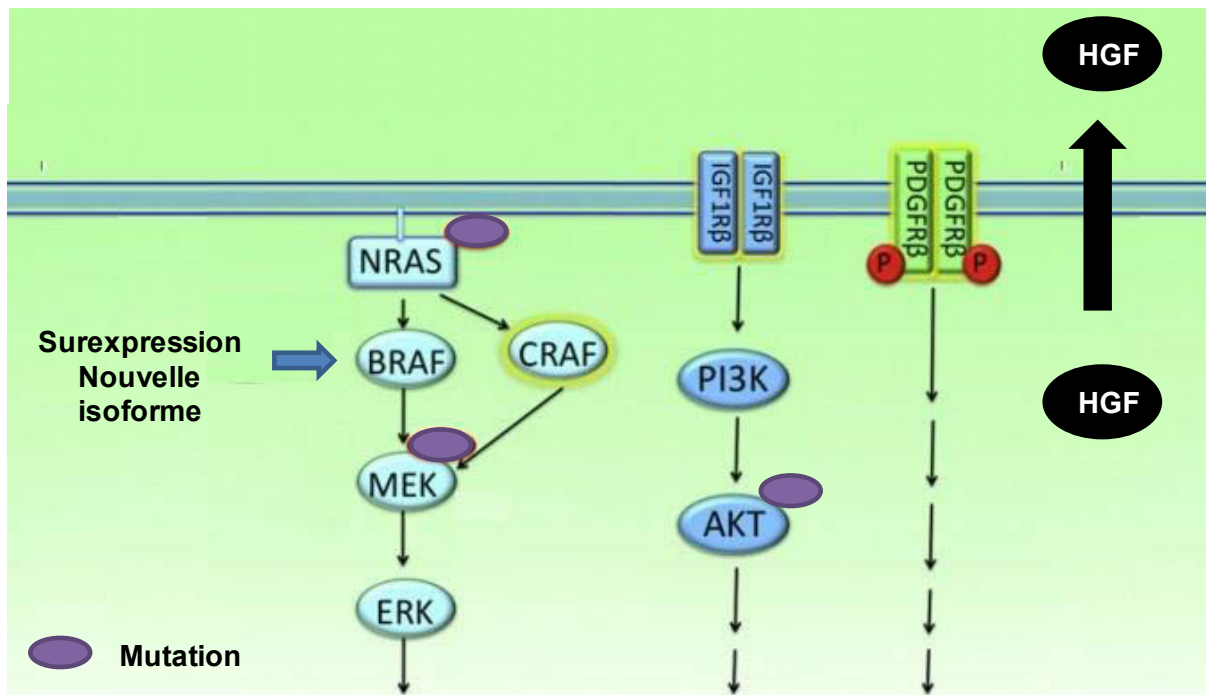
Cette nouvelle classe d'agents anti-immuns a pour but d'augmenter sélectivement la réponse immunitaire anti-tumorale par blocage de PD-1 au niveau des lymphocytes T ou PD-L1 au niveau des cellules tumorales et d'empêcher ainsi l'inactivation des lymphocytes par les cellules cancéreuses. Plusieurs anticorps anti-PD1 sont en développement. Deux d'entre eux (Lambrolizumab, Nivolumab) ont été testés lors de deux études de phase 1 incluant des patients non sélectionnés pour les mutations BRAF et NRAS. Les résultats ont montré un taux de réponse de 50% (208, 209). Une autre étude clinique de phase 1 a été réalisée avec un anticorps anti- PD-L1 (BMS-93655). Cette étude montre un taux de réponse plus faible que celui des anti-PD1 (210).

## **III- Thérapies ciblées**

Différents inhibiteurs ont été développés pour cibler les voies impliquées dans la propagation du mélanome. Les inhibiteurs ciblant les acteurs de la voie des MAPK et de c-KIT sont décrits ci-dessous (**Figure 23**).

### 1) Inhibiteurs de BRAF

Plusieurs inhibiteurs comme Vemurafenib et Dabrafenib ont été développés pour bloquer la kinase BRAF. Contrairement aux premiers inhibiteurs développés (comme le Sorafenib), le Vemurafenib et le Dabrafenib inhibent spécifiquement les kinases actives et en particulier le mutant BRAF (211). Cette spécificité permet d'administrer des quantités plus élevées de drogues sans approcher la dose maximale tolérée et donc d'inhiber plus efficacement la kinase BRAF (212, 213). Ces deux inhibiteurs ont été testés en essais cliniques de phase 3 avec succès. Lors de ces études, il a été démontré que les patients porteurs de la mutation V600E de BRAF présentent des taux de réponse et de survie élevés comparés à ceux traités par chimiothérapie (43, 214). Mais comme pour les anticorps anti CTLA-4, ces inhibiteurs présentent une toxicité. Vemurafenib et Dabrafenib sont à l'origine d'activation paradoxale de la voie MAPK au niveau des cellules sauvages pour BRAF (215, 216), induisant ainsi des hyperkératoses, des carcinomes à cellules squameuses, de l'alopecie et des arthralgies. Il a même été observé dans une minorité de patients, le développement de nouveaux mélanomes primitifs (217) et de leucémie portant une mutation de RAS (218). Presque tous les patients traités avec les inhibiteurs de BRAF ont montré des réponses initiales impressionnantes, par contre ces réponses sont en général incomplètes et de courte durée. Ceci s'explique par



**Figure 24: Mécanismes de résistance mis en place par les cellules de mélanome suite à l'inhibition de BRAF**

Les mécanismes de résistance peuvent toucher l'un des acteurs de la voie MAPK comme N-RAS, CRAF ou MEK 1 afin de réactiver cette voie. D'autres mécanismes de résistance peuvent toucher des acteurs ne faisant pas partie de la voie des MAPK comme l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase comme PDGFR et IGFR ou des modifications micro environnementales comme la sécrétion d'HGF qui provoquent l'activation de voies alternatives comme la voie PI3K, ou encore des aberrations au niveau des voies alternatives elles-mêmes comme la mutation de AKT1.

*Fedorenko 2011* <sup>(224)</sup>

l'installation de mécanismes de résistance en réponse à ces inhibiteurs. Ces mécanismes de résistance peuvent toucher directement BRAF pour augmenter son expression (219) ou pour synthétiser, par épissage alternatif, de nouvelles isoformes résistantes aux inhibiteurs (220). D'autres mécanismes de résistance peuvent toucher l'un des acteurs de la voie MAPK comme N-RAS (221), CRAF (219) ou MEK 1 (222) afin de réactiver cette voie. Un autre type de mécanisme de résistance peut toucher des acteurs ne faisant pas partie de la voie des MAPK. Il s'en suivra l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase (par exemple les récepteurs PDGFR et IGFR), des modifications micro environnementales comme la sécrétion d'HGF qui provoquent l'activation de voies alternatives comme la voie PI3K (223), ou encore des aberrations au niveau des voies alternatives elles-mêmes comme la mutation de AKT1 (221, 224) (**Figure 24**). Il faut noter aussi qu'il a déjà été observé, au sein du même patient et au niveau de la même tumeur, la coexistence de différents mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF (225). Une étude récente sur un modèle de xénogreffe a montré que la délivrance du Vemurafenib par intermittence a un effet bénéfique et induit une réponse au traitement plus prolongée. Les auteurs ont montré que les cellules résistantes au Vemurafenib sont aussi dépendantes de ce dernier car l'hyper activité d'ERK peut induire l'arrêt du cycle cellulaire. Lors de l'administration du Vemurafenib, ERK reste activé grâce aux mécanismes de résistance mis en place et l'interruption du traitement permet la réactivation de BRAF ce qui engendre une hyper activité d'ERK. Le traitement par alternance va ainsi permettre à la fois d'éliminer les cellules tumorales résistantes au traitement lors de l'interruption du traitement et non résistantes lors de l'administration du Vemurafenib (226).

## 2) Inhibiteurs de MEK

L'utilisation de cette catégorie d'inhibiteurs doit permettre d'inhiber la voie MAPK en aval de BRAF et de NRAS car les mutations de ces deux kinases sont à l'origine de 80% des mélanomes (227). Ainsi un plus grand nombre de patients serait considéré pour l'utilisation de ce type d'inhibiteur. Le Trametinib est le premier inhibiteur de MEK ayant atteint un essai clinique de phase 3. Cet inhibiteur a un effet bénéfique sur les patients porteurs de la mutation BRAF et qui sont naïfs aux traitements avec les inhibiteurs de la voie MAPK. Cependant, aucun effet n'a été observé pour ceux qui ont déjà été traités avec les inhibiteurs de BRAF (228, 229). Les toxicités liées à l'administration du Trametinib sont relativement modérées et ne requièrent pas l'interruption du traitement. A titre d'exemple, des cas d'éruption acnéiforme, d'hypertension, de diarrhée, d'œdème, de dysfonctionnement cardiaque



réversible et modéré, de toxicité oculaire et d'élévation de la créatine kinase ont été observés. Le Trametinib est actuellement évalué par la FDA et d'autres agences internationales pour son entrée sur le marché du médicament.

20 % des mélanomes portent une mutation pour NRAS, et ces mélanomes présentent un mauvais pronostic en comparaison à ceux qui présentent une mutation au niveau de BRAF (181). Il est cependant difficile de développer un inhibiteur ciblant une protéine G comme NRAS et les inhibiteurs de BRAF sont incapables d'inhiber la voie MAPK dans le cadre d'une mutation activatrice de RAS car une fois inhibées, les isoformes ARAF et CRAF prennent le relais pour activer la voie (215, 216). C'est pour cette raison qu'une cible plus en aval dans la voie, comme MEK, a été choisie pour traiter ce type de mélanome. MEK162 a été testé en essai clinique de phase 2 pour le traitement de patients présentant la mutation NRAS. Les résultats ont montré une bonne réponse des patients et un essai clinique de phase 3 est programmé (230).

### 3) Inhibiteurs de c-Kit

Parmi les inhibiteurs testés pour le traitement de patients atteints de mélanome avec une mutation activatrice de c-Kit, on peut citer l'Imatinib mesylate et le Nilotinib. Les essais cliniques de phase 2 ont montré une activité significative de l'Imatinib mesylate chez les patients mutés pour c-Kit avec un taux de réponse de 23% (231). Des résultats préliminaires de l'essai clinique de phase 2 du Nilotinib ont montré aussi une bonne activité anti tumorale avec un profil toxique très favorable pour les patients (232). Comme pour les inhibiteurs de BRAF et de MEK, certains patients traités avec les inhibiteurs de c-Kit développent des résistances. Ces résistances sont acquises par une mutation secondaire qui va réactiver le récepteur (233). De plus, certains patients présentent des mutations de c-Kit insensibles à ces inhibiteurs (234). Lors d'une étude récente (49), il a été démontré que, suite à la stimulation par le ligand SCF ou à la mutation de c-Kit, 1) il y a activation de la voie MAPK et de la voie PI3K, 2) la voie PI3K participe à l'activation de la voie MAPK et 3) l'inhibition spécifique de ces deux voies a un effet synergique sur l'apoptose des cellules tumorales. Les auteurs de ces travaux suggèrent donc l'utilisation de ces deux inhibiteurs simultanément pour le traitement des patients présentant une mutation pour c-Kit.

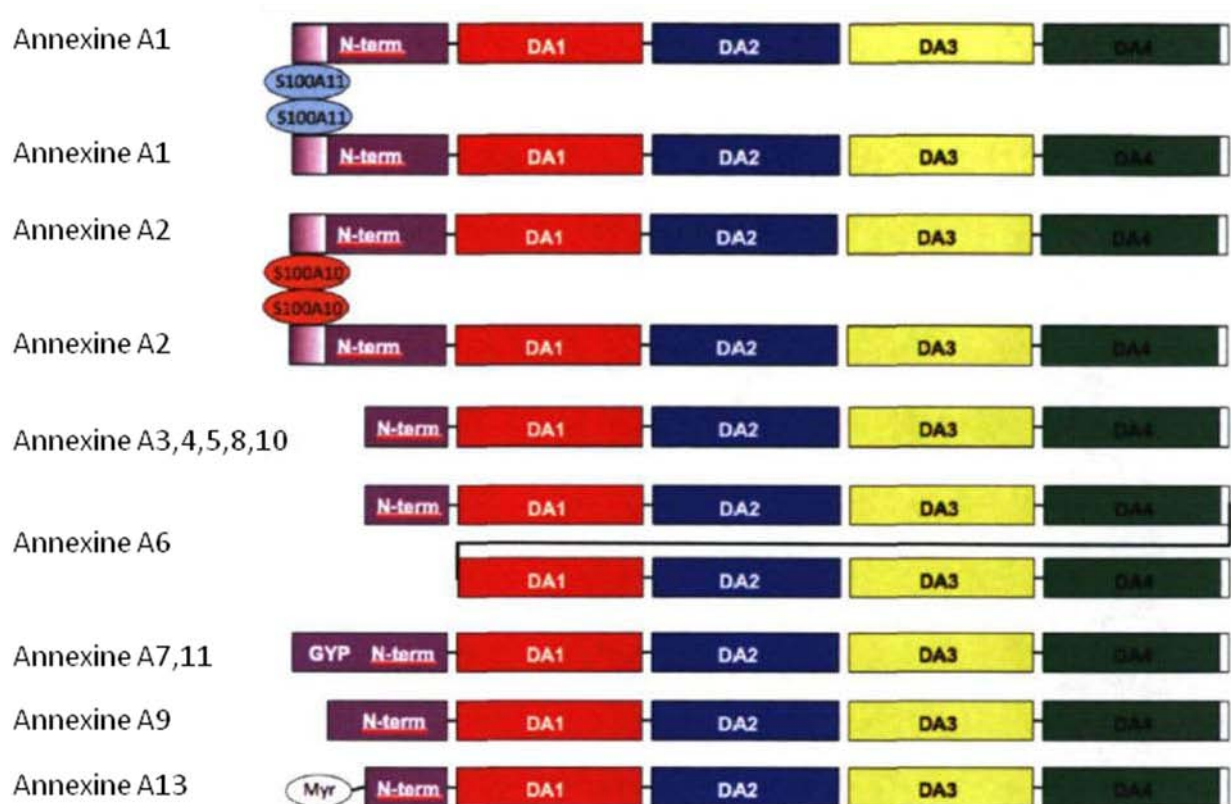


#### **IV-Traitement par association de deux médicaments**

Actuellement plusieurs essais cliniques sont en cours pour tester trois associations différentes de traitement : 1) deux inhibiteurs de la voie MAPK 2) un inhibiteur de la voie MAPK et un inhibiteur de la voie PI3K 3) un inhibiteur de la voie MAPK et de l'immunothérapie (235).

A titre d'exemple, la combinaison d'inhibiteurs de BRAF (Dabrafenib) et de MEK (Trametinib) a été l'objet de tests cliniques de phase 1/2. L'objectif de ces associations est double, il s'agit : 1) de prolonger la médiane de survie sans progression des patients en empêchant l'installation des mécanismes de résistance cellulaire dépendant de la voie MAPK ; 2) de réduire les toxicités dont l'inhibiteur de BRAF est à l'origine comme l'activation paradoxale de la voie MAPK dans les cellules sauvages pour BRAF. Les données montrent que la réponse globale est meilleure que lors de l'utilisation de l'inhibiteur de BRAF seul. De plus, les effets secondaires liés au traitement sont moins importants en utilisant les deux inhibiteurs plutôt que le Dabrafenib seul. Il a été recensé moins de cas d'hyperkératose, d'alopécie et d'arthralgie. Et surtout, moins de cas de carcinome à cellules squameuses ont été observés (7% pour Dabrafenib et Trametinib en association contre 19% pour le Dabrafenib seul). L'effet secondaire le plus observé était la fièvre (236).





**Figure 25 : Structure des membres de la famille des annexines**

Les membres de la famille des annexines possèdent une structure similaire constituée de quatre domaines répétés, huit dans le cas de l'ANXA6 (DA=domaine annexine). Les annexines sont classifiées selon leur domaine N-terminal lequel est très variable en longueur et en séquence. Les annexines A1 et A2 possèdent dans leur domaine N-terminal un site de liaison avec leur partenaire protéique S100A11 et S100A10 respectivement. Le domaine N-terminal est également le site de plusieurs modifications post-traductionnelles. GYP = région riche en glycine, tyrosine et proline, Myr = Myristoylation.

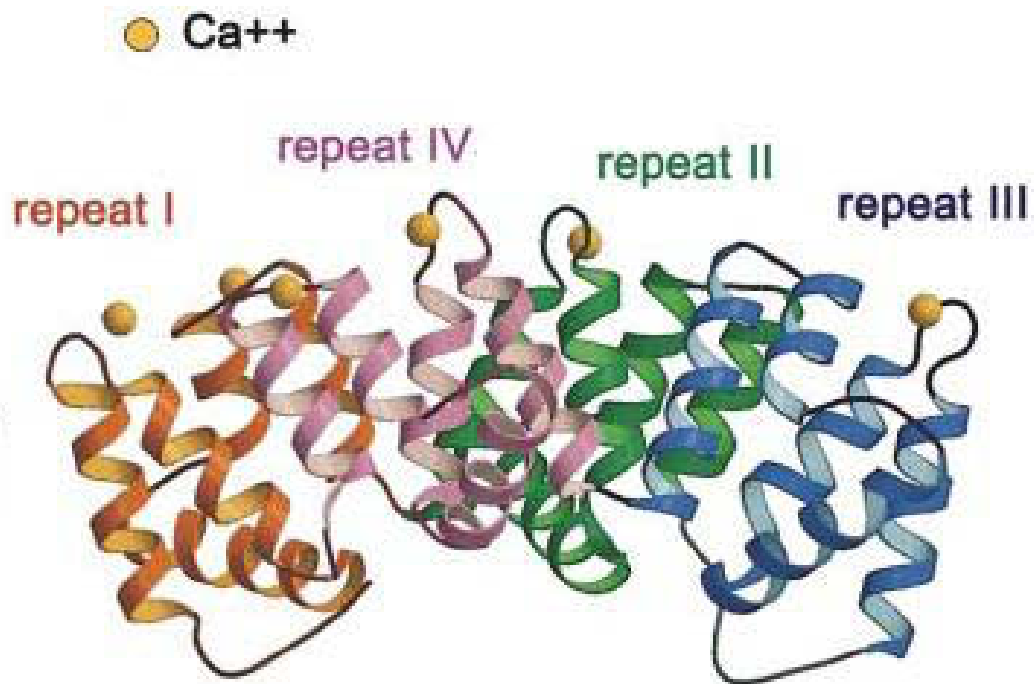
Gerke 2002 <sup>(241)</sup>

## **Les annexines**

Les annexines appartiennent à une famille multigénique de protéines dépendantes du calcium, sensibles au pH et capable de se lier aux membranes. Ces protéines sont présentes dans de nombreux organismes comme les végétaux (237), les levures (238), les parasites (239), les bactéries (240) et les mammifères. Bien que les annexines soient considérées comme des protéines ubiquitaires, ce n'est jamais une seule annexine qui est exprimée. En effet, chaque tissu a son propre profil d'expression d'annexines «empreinte annexine», ce qui implique que la régulation de l'expression des gènes des annexines soit finement contrôlée. Chez les mammifères, 12 membres de la famille des annexines ont été identifiés (A1-A11 et A13) (241) codés par 12 gènes (242). L'une des caractéristiques majeures des annexines est leur propriété à lier les phospholipides acides, portant une ou plusieurs charge(s) négative(s). Cette propriété est essentiellement due au cœur de la structure des annexines, avec un motif C-terminal caractérisé par la liaison aux membranes via des sites conservés qui lient le calcium. Ce motif comporte quatre (huit pour l'annexine A6) domaines répétés de 70 acides aminés. Ces quatre domaines hautement conservés ont des homologies de séquence allant de 40 jusqu'à 70 % (243). Néanmoins, les annexines ont un motif N-terminal variable en séquence et en longueur. Cette région distinctive porte la fonction biologique de chaque membre de la famille. C'est à ce niveau que se produisent les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, protéolyse myristoylation, sumoylation, ubiquitinylation ....) et les interactions avec les différents ligands (**Figure 25**).

### **I- Structure de l'annexine A1**

L'annexine A1 (ANXA1, appelée aussi macrocortine, renocortine, lipomoduline, lipocortine 1, calpactine 2, chromobindine-9, p35, protéine inhibitrice de la phospholipase A2) humaine est une protéine constituée de 346 acides aminés. Dans sa partie N-terminale, la protéine subit un clivage de la méthionine 1 et une N-Acétylation de l'alanine 2 (244). Le motif N-terminal comporte 42 résidus, de l'alanine 2 jusqu'à l'asparagine 43, et le cœur protéique 301 résidus, de la proline 44 jusqu'à la glycine 344.



**Figure 26: Structure tridimensionnelle du corps protéique d'ANXA1**

ANXA1 possède 4 domaines conservés spécifiques des annexines capables de fixer le Ca<sup>2+</sup>.

*John 2004* <sup>(243)</sup>

### 1) Le cœur protéique

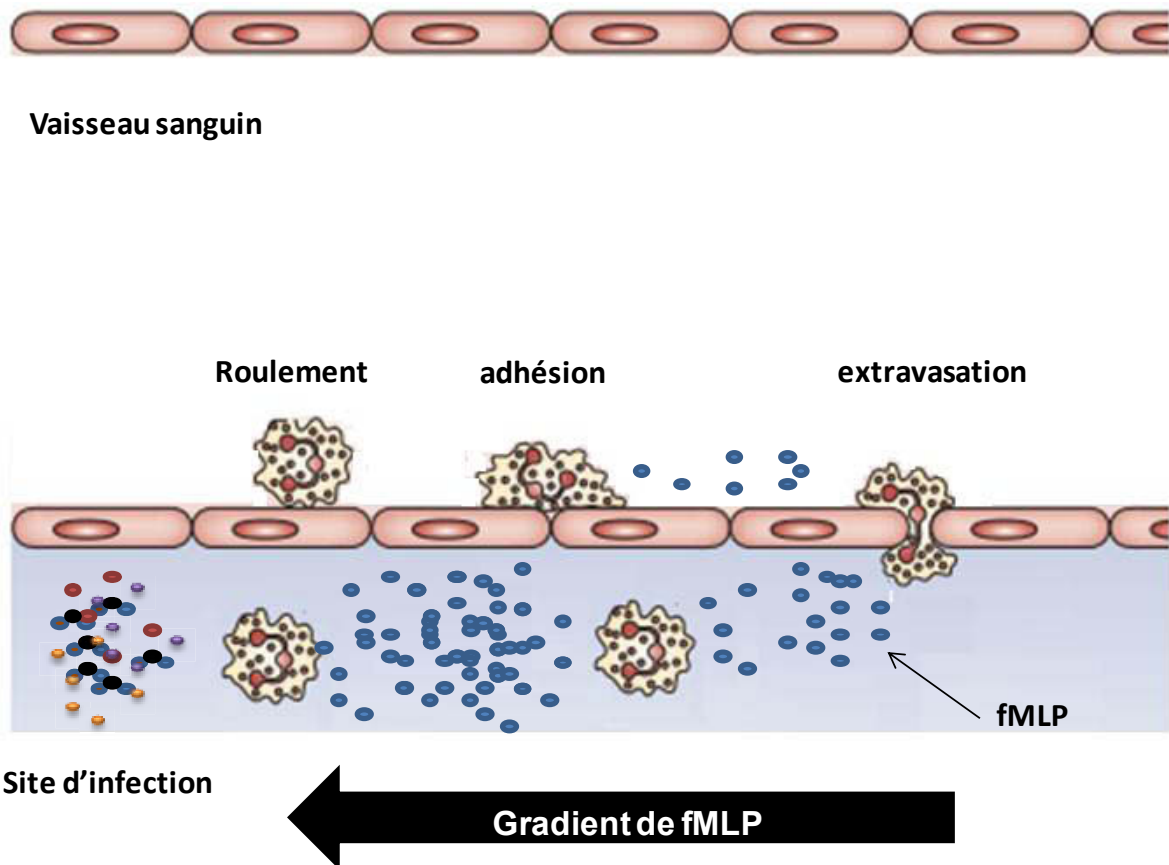
Le cœur de la protéine possède un côté convexe contenant les sites de liaison au calcium et aux membranes et un côté concave faisant face au cytosol impliqué dans les interactions avec des partenaires cytoplasmiques et dans des phénomènes de régulation cellulaire (241, 245). Plusieurs études ont été menées afin de décrypter le mécanisme par lequel ANXA1 se lie à la membrane phospholipidique. De manière générale, ANXA1 lie la surface des membranes contenant des phospholipides chargés négativement comme l'acide phosphatidique, la phosphatidylsérine ou le phosphatidylinositol grâce à l'architecture unique de son site de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  requises pour permettre une liaison maximale à la membrane varient largement d'une annexine à une autre, principalement en fonction de l'affinité et de la spécificité de l'annexine pour le phospholipide présent (245).

L'analyse structurale d'ANXA1 a révélé que le cœur, qui comporte environ 300 acides aminés, possède la forme d'un disque en hélice alpha légèrement recourbé. Les quatre domaines annexines (répétés) sont arrangés de manière cyclique, domaine 1 suivi du 4, du 2 et enfin du 3, formant ainsi une structure compacte que l'on nomme modules de liaison aux membranes stabilisée par des interactions hydrophobes (246). Cette structure compacte est à l'origine de la résistance du cœur protéique aux traitements protéolytiques (**Figure 26**) (247, 248). Cependant, des études *in vitro* ont montré que ANXA1 peut traverser ou s'insérer au niveau de la membrane de façon  $\text{Ca}^{2+}$  indépendante et pH dépendante (249).

### 2) Le motif N-terminal

Le domaine N-terminal est propre à chaque annexine et il définit les propriétés physiologiques de chacune. Ce domaine varie en termes de séquence mais aussi en termes de longueur. Des études de la structure tridimensionnelle d'ANXA1 ont montré que le domaine N-terminal qui comporte 42 acides aminés est localisé dans le côté concave de la protéine, à l'opposé des sites de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'étude cristallographique a montré que la partie N-terminale d'ANXA1, en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , adopte une structure formée d'hélices  $\alpha$  liées au corps protéique par un linker flexible. Les 26 premiers acides aminés forment deux hélices  $\alpha$ , 2-16 et 18-26, qui sont inclinées l'une par rapport à l'autre de  $60^\circ$  au niveau du résidu Glutamate 17. Le peptide 27-43 est non structuré et sert de linker avec le corps protéique (246). En absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , le domaine N-terminal se retrouve enfoui à l'intérieur de la troisième répétition du corps protéique. En présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et fixation de la protéine à la membrane, le domaine N-terminal est expulsé du corps protéique et devient libre pour interagir avec ses



**Figure 27: Chémoattraction des neutrophiles vers le site d'infection**

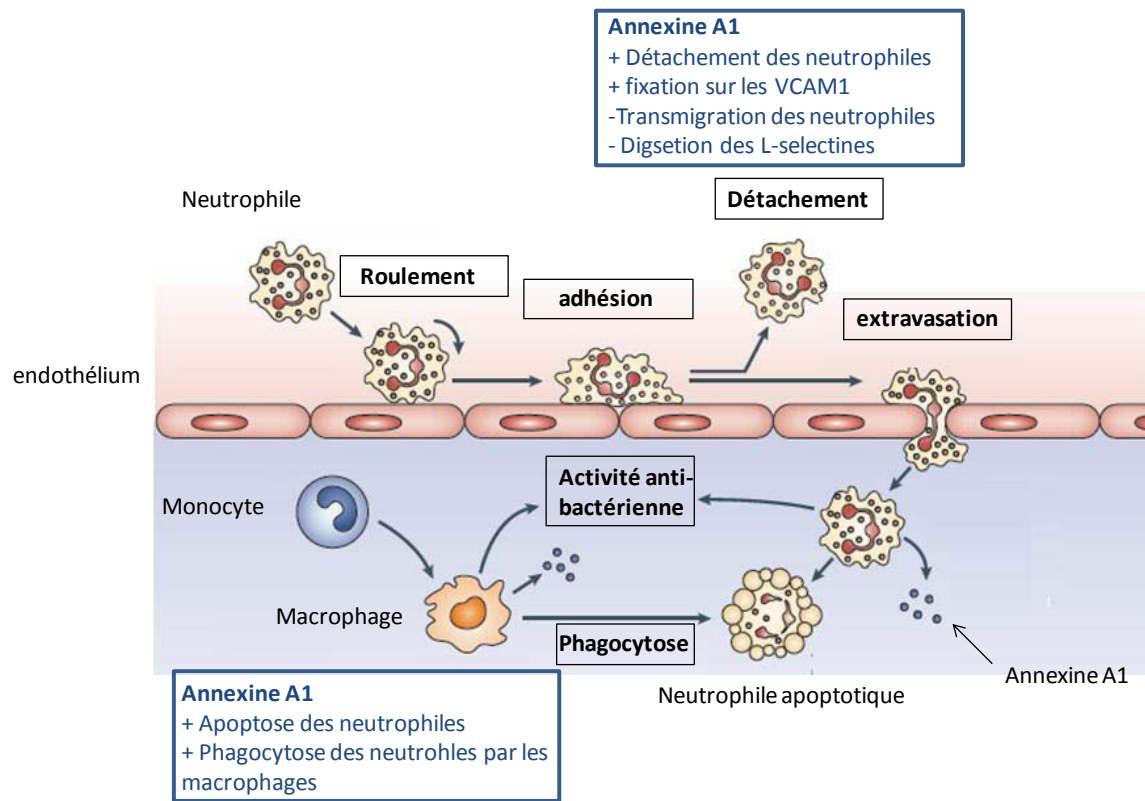
Les fMLP bactériens créent un gradient permettant d'attirer les neutrophiles, *via* les FPRs qu'ils expriment, depuis la circulation sanguine vers le site d'infection.

*Perreti 2009*

ligands ou pour établir une liaison secondaire avec la membrane indépendamment du calcium. En utilisant des ANXA1 tronquées à différentes positions, il a été démontré que les résidus 25-29 jouent un rôle primordial dans la liaison à la membrane. Cette région contient deux acides aminés cationiques (Lys26 et Lys29) et deux serines (Ser27 et Ser28) qui lorsqu'elles sont phosphorylées, empêchent la liaison à la membrane avec son domaine N-terminal. Cette phosphorylation apporte (aux deux serines) des charges négatives permettant de neutraliser les charges positives des lysines avoisinantes et donc, de perturber la liaison à la membrane (250).

## **II- ANXA1 et le contrôle de la réponse inflammatoire**

C'est dans l'inflammation que le rôle d'ANXA1 a été le plus étudié. Cette protéine est considérée comme le médiateur de l'effet anti inflammatoire des glucocorticoïdes et cet effet peut être mis en évidence dans des modèles animaux d'inflammation (251). De plus, l'incubation de différentes lignées cellulaires avec des glucocorticoïdes augmente l'expression d'ANXA1 et sa sécrétion (252). L'effet anti-inflammatoire d'ANXA1 est associé au recrutement, à la migration et à l'activation des granulocytes au niveau des sites d'inflammation (253). Le processus d'inflammation est caractérisé par la migration localisée des granulocytes et d'autres leucocytes depuis le sang jusqu'au tissu enflammé. Ce phénomène dépend d'une régulation très fine des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales allant depuis le roulement jusqu'à l'adhésion sur l'endothélium et la transmigration endothéliale (254, 255). La transition depuis le roulement jusqu'à l'adhésion des neutrophiles requiert l'activation de ces derniers par des facteurs solubles ou associés à la membrane comme les cytokines et les chémo-attractants. Ces derniers forment un gradient permettant aux neutrophiles de migrer jusqu'au site d'inflammation. L'effet anti inflammatoire des glucocorticoïdes serait dû à l'inhibition de la transmigration endothéliale des neutrophiles et à l'externalisation d'ANXA1 (252, 256). Ces observations ont motivé différentes études pour identifier d'une part les partenaires d'ANXA1 impliqués dans la réponse anti-inflammatoire, d'autre part, la caractérisation de la voie par laquelle cette protéine est externalisée car des inhibiteurs des voies de sécrétion classiques (réticulum endoplasmique, appareil de golgi, vésicules de sécrétion) n'avaient pas d'effet sur la sécrétion d'ANXA1 (257).



**Figure 28: Rôle de l'ANXA1 dans la résolution de l'inflammation**  
 Perreti 2009 <sup>(256)</sup>

### 1) les partenaires d'ANXA1 dans l'inflammation

Pour la première fois en 2000, des travaux ont montré qu'ANXA1 et son peptide N-terminal, synthétisé chimiquement, pouvaient se lier aux FPRs exprimés par les neutrophiles (258) et qu'un traitement avec des corticoïdes stimulait l'expression de ces récepteurs (258). Les FPRs reconnaissent les peptides formylés bactériens qui agissent comme chémo-attractants et conduisent les neutrophiles jusqu'aux sites de l'inflammation (**Figure 27**). Il a été montré aussi que le peptide formylé fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) inhibe l'effet anti inflammatoire d'ANXA1 sur les neutrophiles. Dans une lignée HEK293, l'expression ectopique des FPR rend les cellules sensibles à ANXA1 (258). ANXA1 entre en compétition avec les chémo-attractant (les peptides formylés) pour se fixer sur les FPRs des neutrophiles et inhiber leur transmigration endothéliale (241).

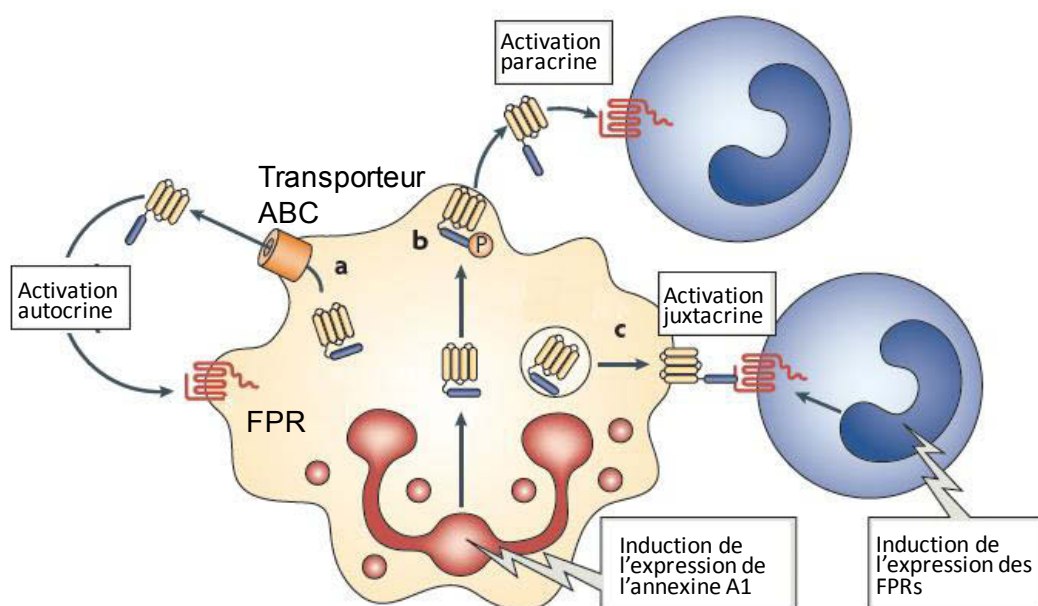
D'autres mécanismes ont été décrits, impliquant ANXA1 dans les réactions anti-inflammatoires. La L-sélectine a été décrite comme l'un des récepteurs exprimés par les leucocytes et permettant la fixation de ces derniers au niveau des endothéliums. ANXA1, en étant à la surface cellulaire, induit une metalloprotéase « la sheddase » qui va dégrader/digérer les L-sélectines (**Figure 28**) (259).

VCAM1 est exprimé par les cellules endothéliales et lie les intégrines  $\alpha 4 \beta 1$  des neutrophiles pour favoriser leur adhésion. ANXA1 peut entrer en compétition avec VCAM1 pour cette fixation inhibant ainsi l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales (260, 261).

Par ailleurs, ANXA1 extra cellulaire provoque l'apoptose des neutrophiles en inhibant la phosphorylation du médiateur proapoptotique BAD (262) et en recrutant les monocytes pour phagocyter les neutrophiles apoptotiques au niveau du site d'inflammation (263) (**Figure 28**).

Le mécanisme d'action d'ANXA1 dans le processus d'extravasation est très complexe. ANXA1 clivée dans sa partie N-terminale a été retrouvée dans le sécrétome des neutrophiles activés. Sous sa forme tronquée, ANXA1 stimule la transmigration endothéliale. Ce processus est associé à la phosphorylation d'ERK et l'expression d'ICAM1 permettant ainsi aux neutrophiles d'adhérer à l'endothélium. Cette découverte suggère donc que le peptide N-terminal et/ou la protéine entière jouent un rôle anti inflammatoire opposé à celui de la forme tronquée pro inflammatoire (264).





**Figure 29: les modes d'activation des FPRs par ANXA1**

ANXA1 peut être secrétée/externalisée : par le transporteur ABC (a), après la phosphorylation du résidu serine 27, elle est lipidée et localisée au niveau de la membrane cytoplasmique avant qu'elle soit transloquée coté externe de la bicouche lipidique et secrétée (b) par la fusion des granules, qui la contiennent, avec la membrane cytoplasmique des neutrophiles. Ces modes de sécrétion/externalisation permettent à ANXA1 d'interagir avec les FPRs de façon autocrine, paracrine ou juxtacrine.

Perreti 2009 <sup>(256)</sup>

Protéase (famille)	Lignée cellulaire/tissu	Site de clivage $P2-P1^{position}/P1'-P2'$
Plasmine (sérine protéase)	Plasma séminal humain	S – K <sup>29</sup> / G - G
ADAM-10 (métallo protéase)	Cellules Jurkat humaines (lymphome)	E – F <sup>7</sup> / L - K
Protéase 3 (sérine protéase)	Neutrophiles humains	Q – A <sup>11</sup> / W - F Y – V <sup>22</sup> / Q - T A – V <sup>36</sup> / S - P
Cathépsine G (sérine protéase)	Neutrophiles murin	V – K <sup>26</sup> / S - Y
Cathépsine D (aspartique protéase)	Kératinocytes humains	A – W <sup>12</sup> / F - I
Calpaïne (cystéine protéase)	<i>In vitro</i> : annexin A1 humaine + Calpaïne	V – K <sup>26</sup> / S - S

**Tableau 3: Tableau récapitulatif des différentes protéases clivant ANXA1** (255, 256, 260, 262, 266, 272)

## 2) Externalisation d'ANXA1

Des inhibiteurs des voies classiques de sécrétion comme la brefeldine A, la monensine, ou le nocodazole n'ont pas d'effet sur la sécrétion d'ANXA1 (257). Trois mécanismes ont été proposés pour l'externalisation et/ou la sécrétion d'ANXA1 :

- par un transporteur ABC (ATP-binding cassette) (265) (**Figure 29a**).
- après la phosphorylation du résidu serine 27, ANXA1 est lipidée et localisée au niveau de la membrane plasmique avant qu'elle soit transloquée coté externe de la bicouche lipidique et sécrétée (266) (**Figure 29b**).
- par la fusion des granules, contenant ANXA1, avec la membrane plasmique des neutrophiles (**Figure 29c**) (267).

Ces observations laissent penser qu'ANXA1, selon sa localisation membranaire ou extra cellulaire, peut interagir avec les FPR de façon autocrine, juxtacrine ou paracrine.

Ce dernier point reste jusqu'à aujourd'hui un sujet très discuté et non élucidé. Deux hypothèses sont proposées :

1) l'interaction entre ANXA1 à la surface des cellules et les FPRs exprimés par les cellules cibles se fait de façon juxtacrine. C'est l'hypothèse la plus plausible. En effet, ANXA1 ne peut rendre sa partie N-terminale accessible que lorsqu'elle est associée à la membrane de façon  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante alors que sous sa forme libre (extracellulaire), son domaine N-terminal est enfoui au niveau du corps protéique rendant impossible toute interaction avec des partenaires protéiques.

2) ANXA1, associée à la membrane cellulaire externe, agit de façon juxtacrine. Le clivage de son domaine N-terminal (263, 268) permettrait de plus de libérer un peptide bio actif lui donnant ainsi la possibilité d'agir de façon autocrine et paracrine (263, 269).

## 3) Le clivage d'ANXA1

Plusieurs études ont montré, *in vivo*, qu'ANXA1 peut subir un clivage dans sa partie N-terminale. Selon la protéase mise en jeu, ce clivage peut se produire à différentes positions de la protéine (**Tableau 3**). A partir de ces observations deux hypothèses ont été émises quant à la signification du clivage d'ANXA1 :



- Ce clivage est un mécanisme homéostatique limitant la fonction biologique de la protéine
- Le clivage d'ANXA1 permet de libérer un peptide bioactif donnant ainsi la possibilité à la protéine d'interagir avec ses partenaires indépendamment de sa liaison aux membranes phospholipidiques.

La première hypothèse a été validée dans le processus d'extravasation des neutrophiles. En effet, en obtenant un mutant d'ANXA1 résistant au clivage par PR3, protéase responsable en partie du clivage d'ANXA1 dans les neutrophiles (270), il a été observé que ce mutant interagit avec les FPRs et induit la même cascade de signalisation qu'ANXA1 sauvage. Cependant, le degré d'inhibition du roulement et d'adhésion des neutrophiles est significativement plus élevé avec ANXA1 mutée. Cela montre que le clivage d'ANXA1 inhibe son effet anti-inflammatoire et permet aux neutrophiles d'atteindre le site d'inflammation (271). L'hypothèse de l'existence d'un peptide bioactif d'ANXA1 a été validée lors du processus d'attraction des macrophages vers les cellules apoptotiques. En effet, il a été démontré que les cellules apoptotiques sécrètent des facteurs qui attirent les macrophages pour les phagocyter. Cette activité a été retrouvée dans une fraction contenant des peptides dont la masse molaire est inférieure à 10 kDa. De plus, une immunodéplétion de cette fraction avec un anticorps anti ANXA1 inhibait l'effet chémo-attractant sur les macrophages. Ces observations permettent donc de conclure sur l'existence d'un ou des peptide(s) ANXA1 bioactif(s) (269).

Par ailleurs, le clivage d'ANXA1 a été observé dans d'autres contextes, notamment dans les kératinocytes et les cellules squameuses et dans le plasma séminal (272).

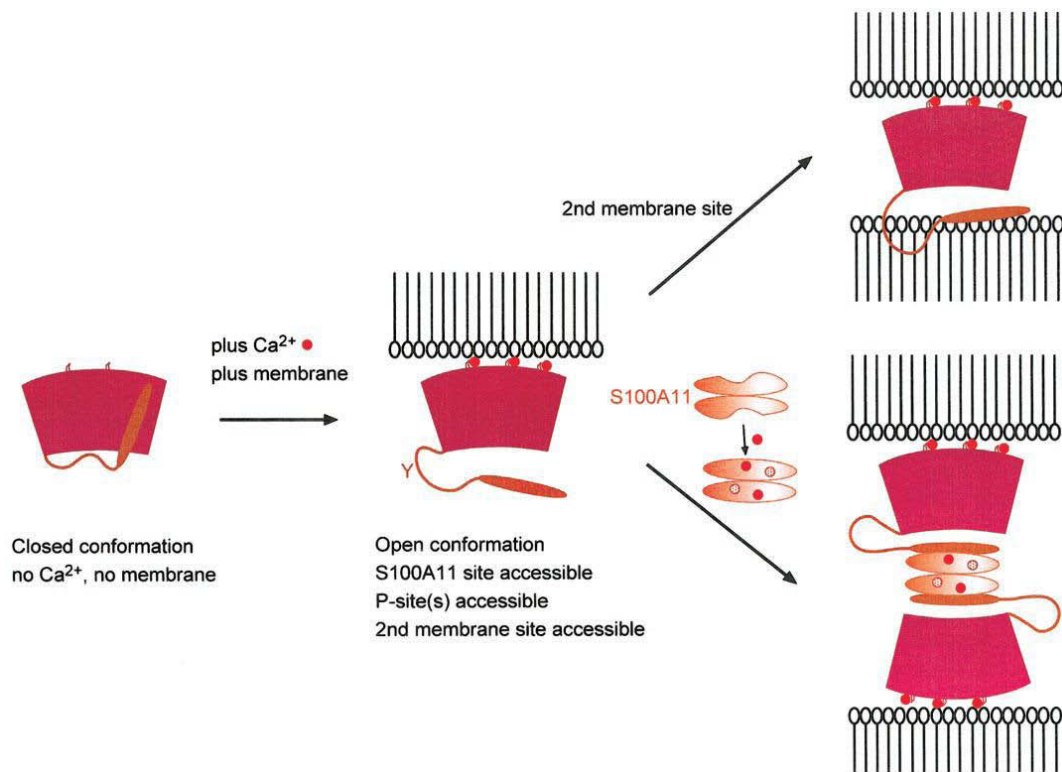
### **III- Fonctions d'ANXA1**

Du fait de ses différentes localisations subcellulaires et tissulaires, ANXA1 peut intervenir dans différents processus cellulaires comme l'agrégation et le trafic membranaire, la survie et la migration.

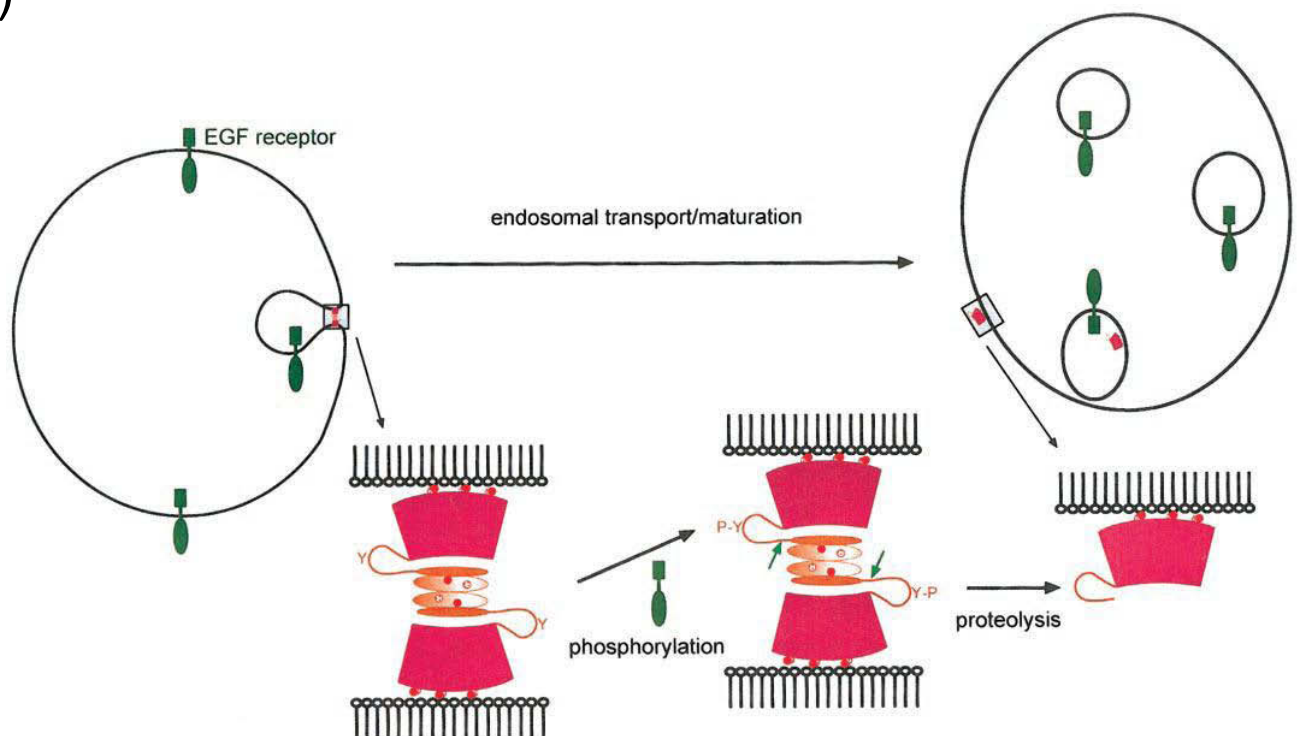
#### **1) L'agrégation membranaire**

L'agrégation membranaire est un processus biologique durant lequel la membrane phospholipidique, dans une zone bien localisée, est recourbée pour la formation de vésicules lipidiques, ou alors deux membranes de deux organelles différentes sont rapprochées pour une

A)



B)



**Figure 30: Rôle d'ANXA1 dans le trafic membranaire**

(A) ANXA1 participe aux processus d'agrégation membranaire soit en formant un complexe, *via* son domaine N-terminal, avec la protéine S100A11 soit en fixant deux membranes par son cœur protéique et son domaine N-terminal. (B) La formation d'un hétérotetramère d'ANXA1 (en rouge) et de S100A11 (en orange) stabilise les interactions membranaires requises lors d'endocytose. Le clivage au niveau de la partie N-terminale d'ANXA1 libère le dimère S100A11 et permet la fission membranaire et la libération interne de la vésicule.

Gerke 2002<sup>(241)</sup>

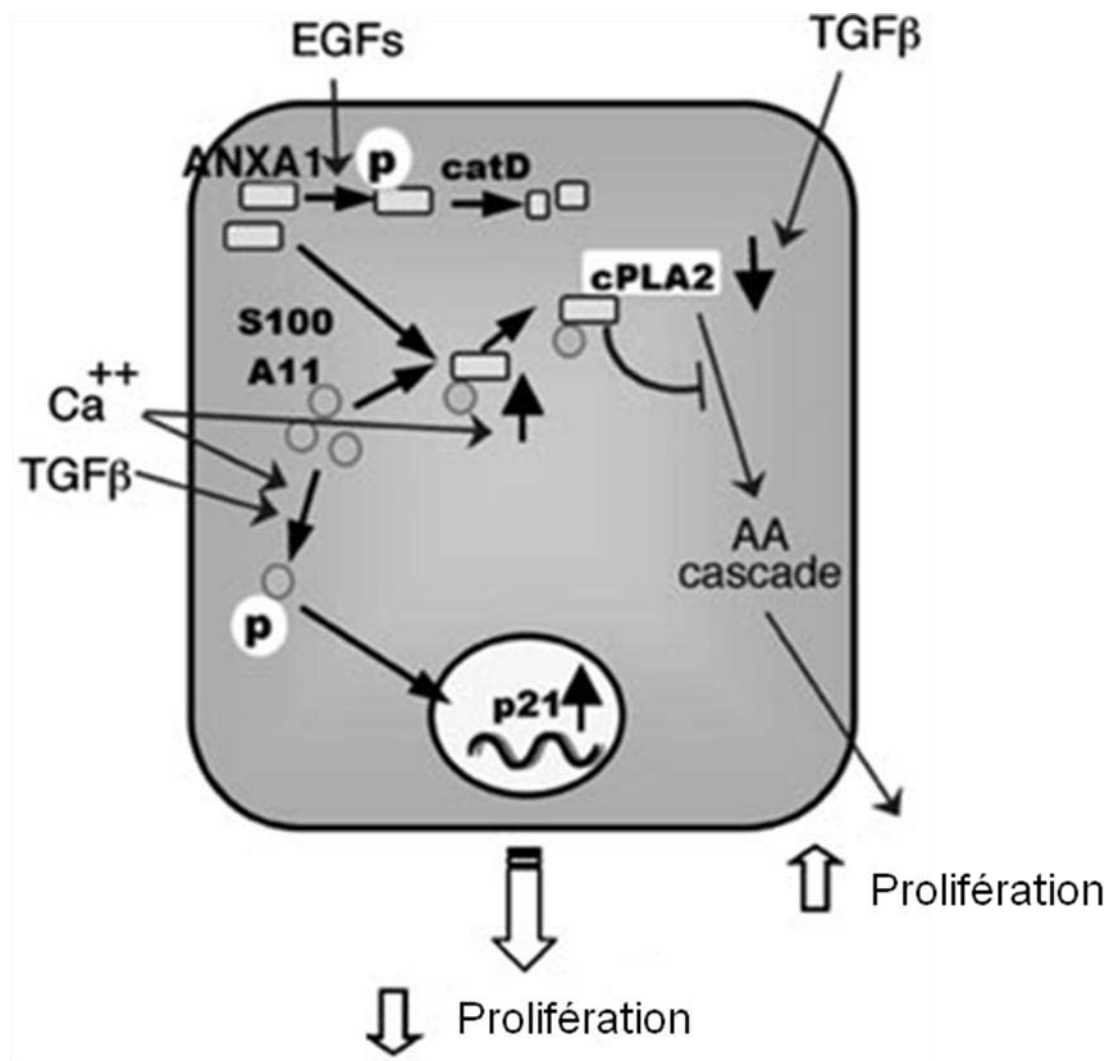
fusion ultérieure. ANXA1 participe au processus d'agrégation entre vésicules et membranes cytoplasmiques par un mécanisme qui suggère que, suite à la fixation d'ANXA1 à la membrane plasmique de façon  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante, le domaine N-terminal est expulsé et devient accessible pour fixer une deuxième membrane de façon  $\text{Ca}^{2+}$  indépendante (**Figure 30**) (250). Un autre mécanisme proposé est basé sur l'interaction d'ANXA1 avec la protéine S100A11 *via* son domaine N-terminal. Vu que la protéine S100A11 a la capacité de former un homodimère, il est donc proposé que deux complexes ANXA1/S100A11 provenant de deux membranes différentes puissent interagir et former un hétérotétramère et rapprocher ainsi les deux membranes (**Figure 30A**).

## 2) L'endocytose

La démonstration la plus évidente du rôle d'ANXA1 dans l'endocytose est l'internalisation du récepteur EGFR. Deux ANXA1 situées de part et d'autre d'un récepteur EGFR pourraient participer à la formation d'un hétérotétramère (ANXA1/S100A11 : voir paragraphe précédent). La phosphorylation d'ANXA1 par le récepteur internalisé dans l'endosome précoce va permettre la protéolyse d'ANXA1 au niveau de son domaine N-terminal et permettre la libération de l'homodimère S100A11 et la fermeture de la vésicule (241) (**Figure 30B**).

## 3) L'exocytose

L'étape finale dans l'exocytose des protéines est la fusion de la membrane des vésicules de sécrétion et de la membrane plasmique. Lors de cette étape, les vésicules de sécrétion matures s'accumulent à l'intérieur de la cellule jusqu'à ce qu'une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme accélère les étapes finales de contact entre les membranes pour permettre la fusion membranaire. Les protéines spécifiques des vésicules se nomment les v-SNAREs et celles de la membrane plasmique se nomment les t-SNAREs. Ces protéines interagissent entre elles et réarrangent la bicouche lipidique pour permettre la fusion des membranes (273). L'un des événements précoces se produisant lors de la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans est l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique. ANXA1 phosphorylée co-localise avec les vésicules de sécrétion de l'insuline, et l'inhibition de cette phosphorylation diminue



**Figure 31: Induction de la prolifération par la phospholipase A2 dans les cellules épithéliales**

L'interaction entre ANXA1 et S100A11 inhibe la prolifération stimulée par la phospholipase A2. La phosphorylation d'ANXA1 par EGFR va induire son clivage par la cathépsine D la rendant incapable d'interagir avec la phospholipase A2.

*Sakaguchi 2007<sup>(275)</sup>*

Le rôle d'ANXA1 a été aussi étudié lors de la dégranulation des neutrophiles. Il a été observé *in vitro* que la fusion de liposomes synthétiques formés de phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylsérine avec des extraits membranaires de neutrophiles augmente en présence d'ANXA1 recombinante. Cela prouve l'implication d'ANXA1 dans les voies de sécrétion mais son rôle exact reste à déterminer (274).

#### 4) La prolifération

ANXA1 peut stimuler ou inhiber la prolifération selon le type cellulaire. Cela pourrait expliquer en partie le fait qu'elle soit surexprimée ou sous exprimée dans les cancers. Il a été montré dans les kératinocytes qu'ANXA1 inhibe la prolifération cellulaire. Cette dernière forme un complexe avec la protéine S100A11 permettant d'inhiber l'activité de cPLA2 (phospholipase A2 cytoplasmique), essentielle pour la prolifération cellulaire. Par ailleurs, lors de la transformation maligne des kératinocytes, l'activité d'EGFR devient constitutive permettant ainsi de phosphoryler ANXA1. Cette phosphorylation va engendrer le clivage d'ANXA1 par la cathepsine D, la rendant incapable d'inhiber cPLA2 et de fait la prolifération cellulaire (**Figure 31**) (275).

La stimulation hormonale de cellules mammaires cancéreuses induit l'expression d'ANXA1 associée à celle de p21, provoquant un arrêt de la croissance cellulaire (276).

Cependant, ANXA1 peut aussi favoriser la prolifération. Par exemple, lorsqu'elle est phosphorylée par PDGF et HGF, ANXA1 stimule la division des hépatocytes (277).

#### 5) L'apoptose

Dans différentes études, ANXA1 a été décrite comme un régulateur de l'apoptose. Certaines équipes de chercheurs ont montré qu'ANXA1 joue effectivement un rôle pro-apoptotique alors que d'autres la qualifient comme un marqueur de résistance à l'apoptose. La raison de ces observations contradictoires est toujours inconnue, mais la lignée cellulaire et le stade de différenciation restent les raisons les plus plausibles. L'implication d'ANXA1 dans l'apoptose a été démontrée initialement dans les conduits lactiques mammaires où une apoptose prononcée a été observée lors de la surexpression d'ANXA1 (278). Dans les thymocytes il a été démontré qu'ANXA1, en présence d'eau oxygénée, engage les cellules dans un processus de mort programmée et les protège de la nécrose (279). Par ailleurs, la transfection de monocytes avec un vecteur d'expression d'ANXA1 induit spontanément une apoptose dans 70% des cellules transfectées avec l'activation de la caspase 3 (280) et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$





monocytes avec un vecteur d'expression d'ANXA1 induit spontanément une apoptose dans 70% des cellules transfectées avec l'activation de la caspase 3 (280) et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  (262). Un autre mécanisme a été décrit pour ANXA1 lors de l'induction de l'apoptose. L'incubation des neutrophiles avec ANXA1 induit l'apoptose en inhibant la phosphorylation de BAD et en permettant à ce dernier de s'associer aux mitochondries (262). Paradoxalement, une étude a montré qu'ANXA1 rend les monocytes résistants au  $\text{TNF } \alpha$ , inducteur d'apoptose, et que l'expression d'ANXA1 est significativement plus importante dans les monocytes résistants à cette cytokine (281). Dans des cellules de tumeur de prostate, ANXA1 inhibe l'apoptose induite par le facteur TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) un membre de la famille TNF (282).

#### 6) La migration

Dans différents processus physiologiques, ANXA1 joue un rôle important dans la migration cellulaire. Dans une étude récente il a été montré que lors de l'angiogenèse, ANXA1 joue un rôle clé dans la migration des cellules endothéliales induite par VEGF. *In vitro*, son rôle est primordial dans la formation des lamellipodes, et l'inhibition de son expression *in vivo* perturbe considérablement la néo-angiogenèse (283). Dans le but d'expliquer le problème de cicatrisation chez les patients diabétiques, une étude en endocrinologie a été réalisée. Il en ressort que (284) :

- les fibroblastes cutanés expriment les FPR2, cibles d'ANXA1
- ANXA1 sécrétée et/ou associée à la membrane plasmique stimule ses récepteurs et induit la migration cellulaire
- dans des conditions d'hyperglycémie, ANXA1 externalisée diminue significativement

Ces résultats donnent ainsi un rôle important à ANXA1 dans les processus de migration et de cicatrisation.

Une autre étude a montré le rôle d'ANXA1 dans la différenciation et la migration des myoblastes. Cela suggère son importance dans les mécanismes de réparation du tissu musculaire (285).

Annexine	Expression (↑ = augmenté ↓ = diminuée)		Type de tumeur
	↑	↓	
A1	↑		CEsophage, estomac, colon, pancréas, foie, rein, poumon, gliome
A1		↓	CEsophage, tête et coup, sein, prostate
A2	↑		estomac, colon, pancréas, foie, rein, gliome
A2		↓	prostate
A3	↑		prostate
A4	↑		Colon, rein
A6	↑		peau
A7	↑		Sein, gliome
A7		↓	prostate
A8	↑		pancéras
A8		↓	sein
A9			Aucune étude
A10		↓	Foie (annexin A10 clivée)
A11	↑		colon
A11		↓	prostate
A13			Aucune étude

**Tableau 4: Changement d'expression des annexines dans différents cancers**

*Mussunoor 2008* <sup>(286)</sup>

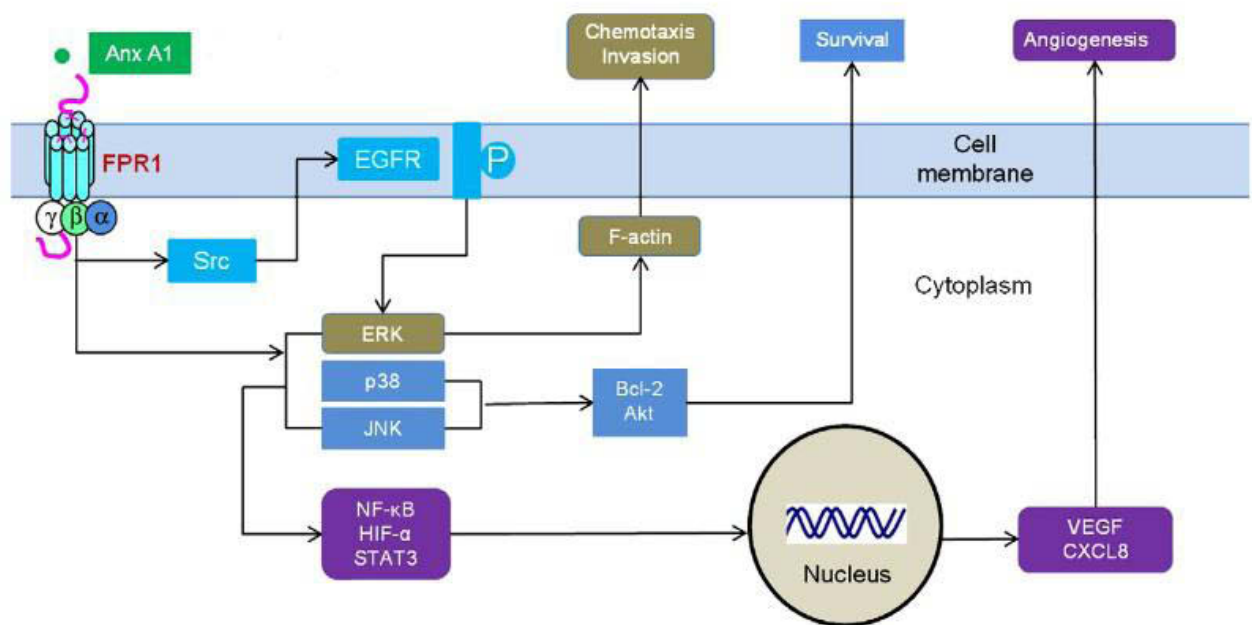
C'est pour cela que l'expression des différentes annexines est souvent dérégulée dans les cancers. Certaines annexines sont surexprimées alors que d'autres sont sous exprimées (**Tableau 4**). Plusieurs des gènes codant pour les annexines sont localisés dans des régions chromosomiques dont la perte ou l'amplification est fréquente dans les cancers, ce qui suggère que certaines annexines pourraient jouer le rôle de suppresseur ou de promoteur de tumeur.

A titre d'exemple, des dérégulations des ANXA1, 2, 3, 7 et 11 dans le cancer de la prostate, des ANXA1, 2, 4 et 10 dans le cancer hépatique et des ANXA1, 5, 6, 8 et 7 dans le cancer du sein ont été associées à la propagation tumorale (286, 287). De plus, au sein d'une même tumeur, certaines annexines sont anormalement surexprimées alors que d'autres sont sous exprimées. Ceci suggère que les annexines agissent en synergie dans les processus de propagation tumorale (288) et/ou la perte d'expression d'une annexine est compensée par la surexpression d'une autre (289). A titre d'exemple, L'association entre l'expression des annexines A2, A4 et A11 et le stade tumoral a été rapporté dans les tumeurs colorectales (290).

Jusqu'à maintenant, la plupart des études se sont souvent focalisées, dans chaque type de cancer, sur le rôle d'un seul membre de la famille des annexines. Cependant, les processus de synergie et de compensation entre les différents membres de cette famille ont toujours été ignorés.

## 2) ANXA1

Comme ANXA1 joue un rôle primordial dans l'apoptose, la prolifération, l'adhérence et la migration, la dérégulation de son expression est associée à la cancérogenèse. En effet, il a été observé que son expression est augmentée dans certains cancers et diminuée dans d'autres. Là aussi, comme pour les processus de prolifération, d'apoptose et d'inflammation, selon le tissu et le stade de différenciation, l'expression d'ANXA1 peut favoriser ou inhiber la cancérogenèse. Par exemple, il a été démontré que l'expression d'ANXA1 dans le cancer de l'œsophage est diminuée (291). Des analyses génétiques sur des lignées cellulaires ont montré que la perte allélique d'ANXA1 se produit fréquemment alors que les mutations somatiques sont rares. La perte de l'expression d'ANXA1 dans le cancer de la prostate est particulièrement évidente et corrèle avec les stades précoces du processus de tumorigenèse. Dans les cancers de la tête et du cou, la perte d'expression d'ANXA1 est associée avec le stade avancé de la pathologie, les métastases et le stade de différenciation (292). Cependant, il



**Figure 32: Implication d'ANXA1 dans la propagation du glioblastome**

La fixation d'ANXA1 sur les FPRs des cellules de gliome stimule l'invasion, la survie cellulaire et l'angiogenèse *via* la voie MAPK.

*Liu 2012* <sup>(192)</sup>

a été reporté que l'expression d'ANXA1 est augmentée dans les cancers pulmonaires, colorectaux, de la vessie, gastrique, pancréatique et dans les gliomes (191, 293-295) (296, 297).

C'est dans le cas du cancer du sein que les différences d'expression d'ANXA1 sont les plus marquantes. Selon les études, une perte d'ANXA1 ou une amplification de son expression est observée (298, 299). Le statut des récepteurs à l'œstrogène pourrait expliquer ces observations contradictoires. En effet, l'incubation avec l'œstrogène de cellules cancéreuses du sein, positives pour les récepteurs à l'œstrogène, agit sur l'expression d'ANXA1. A des concentrations physiologiques d'œstrogènes, ANXA1 stimule la prolifération cellulaire alors qu'à forte dose elle l'inhibe (276).

La majorité des études associant ANXA1 au développement et à la propagation tumorale sont réalisées en comparant l'expression d'ANXA1 soit dans un tissu pathologique avec un tissu sain soit dans des tumeurs hautement agressives avec des tumeurs qui ne le sont pas. Néanmoins, certaines études ont permis de déchiffrer les mécanismes moléculaires associées à la surexpression de l'ANXA1 et à la propagation tumorale.

Il a été montré dans des cellules de glioblastome malin qu'ANXA1 extracellulaire se liait à FPR1. L'activation des FPR1 va induire la phosphorylation de différents acteurs de la voie MAPK comme p38, JNK, et ERK. Cette activation a 3 conséquences (**Figure 32**).

Elle va stimuler (192):

- les facteurs de transcription STAT3, NFκB et HIF1α et permettre ainsi leur translocation nucléaire. Dans le noyau, ces facteurs de transcription vont transcrire les gènes de *VEGF* et *CXCL8* et stimuler l'angiogenèse
- BCL2 et AKT pour induire la survie cellulaire
- la F-actine pour stimuler l'invasion

Dans des lignées cellulaires de cancer du sein, il a été montré qu'ANXA1 interagit avec NEMO et RIP1 et stabilise IKK ce qui va permettre la phosphorylation de NFκB et sa translocation nucléaire. Au niveau nucléaire NFκB va transcrire les gènes *uPA*, *CXCR4* et *MMP9* ce qui va augmenter l'invasion cellulaire et la formation de métastases (300, 301). De plus, une autre étude a montré qu'ANXA1, dans des lignées cancéreuses du sein, stimule la voie de signalisation TGF-β/Smad qui est connue pour son implication dans les processus de TEM (302).



Dans des lignées cellulaires de cancer gastrique, il a été reporté qu'ANXA1 extracellulaire peut stimuler FPR1, FPR2 et FPR3. L'activation de ces récepteurs stimule l'invasion cellulaire en induisant la phosphorylation d'ERK et l'expression de la protéine ITGB1BP1 (integrin beta 1 binding protein 1) (191).





# **OBJECTIFS DE LA THESE**



Le mélanome cutané est le plus agressif des cancers de la peau. Une fois métastasé, les options thérapeutiques restent encore insuffisantes. La caractérisation anatomopathologique de la lésion primitive décide de la prise en charge thérapeutique des patients. Parmi les différents marqueurs, l'indice de Breslow (épaisseur de la tumeur) reste le facteur pronostique le plus performant. Cependant, 15% des patients ayant des tumeurs à faible indice de Breslow, développent des métastases, il y a donc une nécessité d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques impliqués dans la dissémination du mélanome cutané.

Dans le laboratoire, une étude avait été menée afin de mettre en évidence de nouveaux marqueurs pronostiques du mélanome cutané. Pour ce faire, une étude a été menée pour comparer le protéome de deux lignées de mélanome murin génétiquement semblables: B16F0 et B16Bl6, qui induisent toutes les deux la formation d'une tumeur primitive, alors que seules les tumeurs B16Bl6 génèrent des métastases. Parmi les protéines différentielles identifiées, ANXA1 est plus exprimée dans les cellules et les tumeurs B16Bl6. De plus, l'inhibition de l'expression d'ANXA1 par siRNA, *in vitro*, diminue significativement le pouvoir invasif de la lignée B16Bl6. Il a été également montré par RT-PCR que les lignées B16 expriment les FPRs et que l'induction et l'inhibition de ces récepteurs par des ligands spécifiques modulent l'invasion cellulaire. Ces résultats suggèrent le rôle possible de l'axe FPRs/ANXA1 dans l'invasion du mélanome murin (194).

**L'objectif de la thèse a été de valider les données obtenues sur les modèles murins dans les modèles humains et d'étudier le rôle et le mécanisme d'action d'ANXA1 dans l'invasion du mélanome cutané.** A cet effet, nous avons étudié lors d'une étude rétrospective sur deux centres (Clermont-Ferrand, Saint-Etienne), l'association entre l'expression d'ANXA1 dans des biopsies de mélanome primitif et l'évolution de la pathologie chez les patients. Nous avons par la suite évalué l'impact de la présence d'ANXA1 sur la propriété invasive de différentes lignées de mélanome. Une fois l'implication d'ANXA1 dans



# **MATERIELS**

# **ET**

# **METHODES**

<b>Inhibiteurs (Sigma)</b>	<b>Concentration finale des inhibiteurs</b>	<b>spécificité</b>
<b>3,4 dichloroisocomarin</b>	50 $\mu$ M	inhibiteur des protéases à sérine
<b>E64</b>	20 $\mu$ M	inhibiteur des protéases à cystéine
<b>Pepstatine A</b>	2 mM	inhibiteur des protéases à acide aspartique
<b>1,10 Phenantroline</b>	75 $\mu$ M	inhibiteur des métalloprotéases
<b>TPCK</b>	250 $\mu$ M	inhibiteur de protéase à sérine
<b>Benzamidine</b>	600 $\mu$ M	inhibiteur de protéase à sérine
<b>Chymostatine</b>	250 $\mu$ M	inhibiteur de protéase à sérine
<b>Antipaïne</b>	250 $\mu$ M	inhibiteur de protéase à sérine
<b>Aprotinine</b>	30 $\mu$ M	inhibiteur de protéase à sérine

**Tableau 1 : Nature et concentration des inhibiteurs de protéases testés**

La partie expérimentale ainsi que les résultats et discussion sont divisés en deux parties qui traitent d'une part de « l'implication d'ANXA1 dans la dissémination du mélanome cutané », et d'autre part de « l'expression des annexines et caractérisation du clivage d'ANXA1 dans le mélanome ». La première partie des travaux de thèse est rédigée sous la forme d'une publication et comporte donc toute la procédure expérimentale associée. Dans ce chapitre, sont décrites les techniques utilisées dans la deuxième partie de ces travaux.

### **I- Tumeurs humaines**

Les études ont été réalisées sur des souris nudes (Charles River). Les tumeurs ont été obtenues après injection sous cutanée de  $3.10^6$  cellules A375, M4Beu, M3Dau et SK-MEL3. Environ un mois après l'inoculation des cellules, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs prélevées et congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour l'extraction des protéines.

### **II- Culture cellulaire et traitements**

#### **1) Culture cellulaire**

Les lignées humaines de mélanome M4Beu et M3Dau ont été fournies par le Dr.Doré (INSERM, Lyon), les lignées A375, SK-MEL3 et WM1552c ont été obtenue à l'ATCC.

Les lignées ont été cultivées en monocouche et en atmosphère humide à  $37^{\circ}\text{C}$  sous 5% de  $\text{CO}_2$  dans différents milieux de culture. Les lignées A375, M3Dau et M4Beu ont été cultivées dans un milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté avec 15 % de SVF (Biowest). Les lignées SK-MEL3 et WM1552c ont été cultivées respectivement dans un milieu McCoy's 5A (Gibco) supplémenté avec 15% de SVF et dans un milieu MW489 (25% de milieu Leibowitch-Invitrogen ; 75% de milieu MCDB153-Sigma) complémenté avec 4% de SVF. A tous les milieux ont été ajoutés  $4\mu\text{g/mL}$  de gentamycine (Invitrogen).

Le milieu OPTIMEM (Invitrogen) additionné de  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) a été utilisé pour le traitement des cellules avec les inhibiteurs de protéases et pour la récupération des protéines sécrétées.

#### **2) Traitements par des inhibiteurs de protéases**

300 000 à 400 000 cellules A375 ont étéensemencées la veille du traitement dans des plaques six puits. Le jour du traitement ; le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été incubées avec des inhibiteurs de protéases (**Tableau 1**) pendant 18 heures.





### **III- Préparation des protéines**

#### **1) Protéines cellulaires**

Les protéines ont été extraites avec le tampon RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.1% Sodium desoxycholate, 0.1% SDS et 1% d'inhibiteurs de protéases) directement sur le tapis cellulaire ou sur le culot cellulaire récupéré après trypsination et centrifugation à 460 g pendant 8 minutes. Après une incubation de 10 minutes dans la glace, les échantillons ont été centrifugés à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C.

#### **2) Protéines des surnageants**

Les surnageants des cellules A375 ont été récupérés puis centrifugés à 460g pendant 8 minutes pour éliminer des éventuelles cellules flottantes. Les surnageants ont été ensuite concentrés par centrifugation en « centricons » de 500µl (Sartorius) ou 15 mL (Millipore) de cut off respectifs de 10 et 5 kDa à 12 000 g ou 4 500 g à 4°C pendant le temps nécessaire.

#### **3) Protéines associées aux membranes externes de façon calcium dépendante**

300 000 à 400 000 cellules A375 ont étéensemencées en plaques 6 puits. Après adhésion cellulaire le milieu de culture a été éliminé et remplacé par un milieu OPTIMEM (Gibco) contenant 2 mM d'EGTA. Après une heure d'incubation, le surnageant a été centrifugé à 460g pendant 8 minutes à 4°C et le surnageant résultant à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant final a été récupéré et concentré.

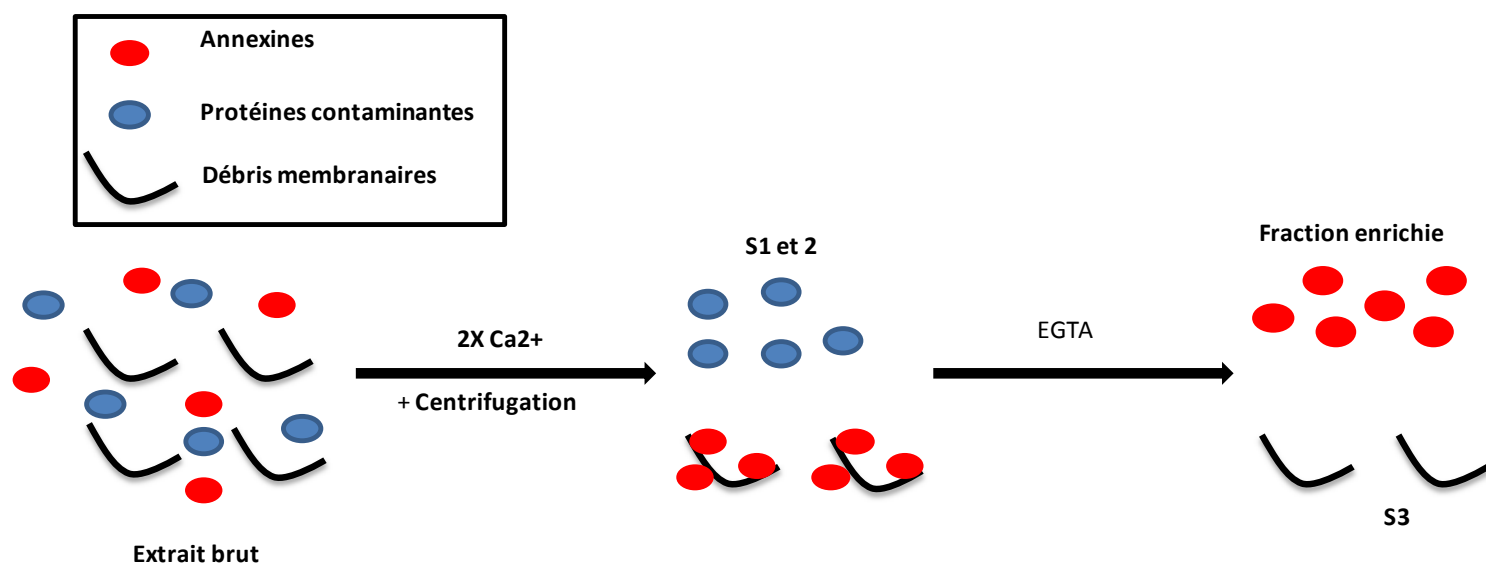
#### **4) Fractionnement subcellulaire**

##### *Préparation des extraits totaux:*

Des culots cellulaires A375 ont été repris dans une solution de lyse contenant 200mM NaCl, 20mM tris-HCl, 1% Triton X100, pH8 à une concentration finale de 30 millions de cellules/mL, puis centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 12 000g. Les surnageants ont été récupérés et stockés à -20°C.

##### *Préparation des fractions cytoplasmiques et membranaires :*

Des culots cellulaires A375 ont été repris dans une solution contenant 20mM Tris-HCl, pH 7,5 à une concentration finale de 30 millions de cellules/mL. Après centrifugation à 300g



**Figure 1 : Schéma de la procédure d'enrichissement en annexines**

pendant 2 minutes à 4°C, les surnageants ont été repris et centrifugés à 800g pendant 45 minutes à 4°C. Les surnageants obtenus ont été récupérés et conservés à -20°C, correspondants à la **fraction cytoplasmique**. Les culots ont été repris dans une solution contenant 20mM tris-HCl, 1% Triton X100 pH7,5 puis centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 12 000g. Les surnageants ont été récupérés et stockés à -20°C, correspondants à la **fraction membranaire**.

#### 5) Enrichissement en annexines

Les tumeurs et les culots cellulaires ont été repris dans un tampon contenant 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5mM EDTA et 1% anti-protéases (pH 7,5) à une concentration finale de 200 mg de tumeur/mL et 300 millions de cellule/mL, broyés avec le Gentle Mac Dissociator (Miltenyi Biotec) et centrifugés pendant 30 minutes à 20 000 g et à 4°C. Le CaCl<sub>2</sub> (5mM) a été ensuite ajouté au surnageant (**extrait brut**), et après incubation pendant 45 minutes dans la glace, une centrifugation à 39 000 g pendant 30 minutes et à 4°C a été réalisée. Le surnageant a été éliminé (**S1**) et le culot a été repris dans une solution contenant 10 mM d'HEPES, 150 mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub> et 1% d'anti-protéases (pH 7,5). Après une centrifugation à 39 000g pendant 30 minutes et à 4°C, le surnageant a été éliminé (**S2**) et le culot a été repris dans une solution contenant 10 mM d'HEPES, 10 mM EGTA et 1% d'anti-protéases (pH 7,5). Après une centrifugation à 100 000 g pendant 30 minutes et à 4°C, le surnageant a été récupéré (**fraction enrichie**) et le culot a été repris dans le tampon de solubilisation (8,75 M urée, 2,5 M thiourée, 50 mM DTT, 5% CHAPS et 1% d'inhibiteur de protéases) (**S3**) (**Figure 1**).

Pour les analyses en Western blot, les fractions enrichies ont été utilisées tels quelles alors que pour les études en électrophorèse bidimensionnelles, elles ont été précipitées à l'acide trichloroacétique (TCA) à une concentration finale de 10%. Après incubation pendant 15 minutes dans la glace et centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 14 000g, les culots (protéines précipitées) ont été séchés puis repris dans le tampon de solubilisation.

Les concentrations en protéines de chaque échantillon ont été déterminées selon la méthode de Bradford par le bleu de Coomassie (Pierce), à 595 nm, en prenant la BSA (sérum albumine bovine) comme référence.



Les concentrations en protéines de chaque échantillon ont été déterminées selon la méthode de Bradford par le bleu de Coomassie (Pierce), à 595 nm, en prenant la BSA (sérum albumine bovine) comme référence.

#### **IV-Electrophorèse bidimensionnelle**

Les strips (7cm, pH 3-10) ont été réhydratés dans 120 µL de tampon de solubilisation et 0.4% d'ampholytes (pI 3-10) en présence des protéines. La réhydratation a été réalisée en deux temps, d'abord passive pendant 11 heures puis active à 50 V pendant 5 heures.

L'ensemble de la réhydratation et de la focalisation a été réalisée à 20°C sur l'appareil Protean IEF Cell (Biorad). La focalisation s'est déroulée selon le programme :

- 15 minutes à 250 V
- 2 heures à 4000 V
- 20000 V/heure à 4000 V
- 500 V jusqu'à l'arrêt

Avant la deuxième dimension, les strips ont été plongés dans un bain contenant du tampon de base (urée 6M, SDS 2%, Tris HCL 50 mM pH 8,8, glycérol 30%) additionné de 1% DTT pendant 15 minutes. Après un rinçage à l'eau milliQ, les strips ont été plongés dans un second bain de tampon de base additionné de 4% d'iodoacétamide (IAM). Les strips ont été ensuite fixés à l'aide d'agarose 1% sur des gels d'acrylamide 12,5% (43.75% d'eau milliQ, 31,25% d'acrylamide (40%), 25% de tampon 4X [1,5M de tris HCl et 0,4% de SDS, pH8,8], 0,06% de TEMED et 0,6% de PAS 10%) . La migration des protéines a été réalisée à 20mA/gel dans un tampon tris-glycine-SDS (25mM / 192mM / 0,1%, pH 8,3).

#### **V- Identification des protéines par spectrométrie de masse**

##### **1) Fractions enrichies en annexines**

Soixante quinze µg de protéines ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle comme décrit précédemment. Les gels ont été ensuite colorés au bleu colloïdal (Biorad) puis scannés par le densitomètre GS-800 (Biorad). Les spots d'intérêt ont été prélevés et identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight) sur un spectromètre Voyager DE-PRO (Applied Biosystems). Pour cela, les pièces de



gel excisées ont été lavées avec un tampon de lavage (25 mM de bicarbonate d'ammonium dans 50% d'acétonitrile (ACN)). Ensuite 50 à 100 ng de trypsine porcine (Proméga) ont été ajoutés à la pièce de gel. Après 16h, les peptides résultants ont été extraits dans 70% d'ACN contenant 0,5% d'acide trifluoroacétique (TFA), puis mélangés à une matrice (acide cyano-4-hydroxycinnamique 7mg/mL 0,1% TFA et 50% d'ACN) et cocrystallisés sur une cible MALDI. La masse des peptides a été mesurée en mode positif entre 800 et 3000m/z. La calibration a été faite en utilisant les peptides d'autodigestion de la trypsine modifiée (842,51000, 1045,5580, 2211,1046). L'identification des protéines a été réalisée par le logiciel MS-FIT (Protein Prospector). Les paramètres d'interrogation utilisés sont les suivants : digestion par la trypsine, les masses sont monoisotopiques avec une tolérance de 50 ppm, les cystéines sont carbamidométhylées et les méthionines peuvent être oxydées, une protéine est validée si au moins 5 peptides sont présents. La recherche est faite en utilisant les bases de données des mammifères (Swissprot).

## 2) Protéines membranaire des cellules A375

Cinquante µg de protéines membranaires des cellules A375 ont été séparées par SDS/PAGE. Les bandes d'intérêt ont été excisées et lavées dans le tampon de lavage. Après une incubation de 15 minutes dans le tampon de lavage additionné de 1% DTT, les bandes ont été lavées puis incubées pendant 15 minutes dans le tampon de lavage additionné de 4% d'IAM. 50 ng de trypsine porcine (Proméga) ont été ensuite ajoutés aux pièces de gel. Après 16h, les peptides résultants ont été extraits dans 70% d'ACN. 8µL du milieu d'hydrolyse ont été injectés en nano HPLC (Ultimate 3000, Dionex) sur une colonne de concentration. Après 6 minutes la colonne de concentration a été mise en ligne avec une colonne C18 analytique (15 cm x 75µm) à nanodébit (300 nl/min). Les peptides élués en gradient d'ACN (4 à 50% en 30 min d'une solution contenant 80% ACN et 0.5% Acide Formique) sont analysés par spectrométrie de masse de type électrospray-trappe ionique (LTQ velos, ThermoScientific). L'appareil fonctionne en mode Top Ten, chaque analyse MS (400-2000 m/z) est suivie par 10 analyses MS/MS effectuées sur les 10 pics les plus intenses de l'analyse MS. Les spectres MS/MS ont été exploités par le logiciel MASCOT dans deux banques distinctes, uniP\_HomoSapiens et EBI\_Mammals. Les paramètres d'interrogation utilisés sont les suivants : digestion par la trypsine, ions précurseurs compris entre 500 et 4000Da, tolérance de 1,5Da pour les ions parents, de 0,5Da pour les ions fragments, alkylation des cystéines, oxydation possible des méthionines. Un peptide est validé quand son score de validation est supérieur à 42 pour la



<b>Anticorps</b>	<b>Dilution</b>	<b>Origine</b>
anti-ANXA1	1/10000	Invitrogen
anti-ANXA6 (H114)	1/200	Santa Cruz Biotechnology
anti-ANXA6 (N19)	1/200	Santa Cruz Biotechnology
anti-actine (C2)	1/200	Santa Cruz Biotechnology
anti-EGFR (D38B1)	1/1000	Cell Signaling Technology

**Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés pour les Western blot**

<b>Tampon de lavage/fixation 2X</b>	<b>Tampon d'Elution</b>
100mM sodium-Phosphate, pH8	300mM Imidazole
600mM NaCl	50mM sodium-phosphate pH8
0,02% Tween®-20	300mM NaCl
	0,01% Tween®-20

**Tableau 3 : Composition des tampons utilisés pour la purification de l'ANXA1 recombinante**

#### **VI-Séquençage N- terminal d'ANXA1 clivée par dégradation d'Edman**

Quatre cents µg de protéines des fractions enrichies en annexines ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle comme décrit précédemment. Après migration, les protéines ont été transférées sur membrane PVDF dans un tampon CAPS (10 mM CAPS, 10% MeOH, pH11) pendant une heure à 30V. Les spots ont ensuite été révélés par coloration rapide (environ 30 secondes) avec du bleu de Coomassie R250.

Les spots correspondant à ANXA1 clivée ont été ensuite coupés de la membrane et 5 cycles de dégradation d'Edman ont été effectués sur un séquenceur Procise-492A (Applied Biosystems) dans les conditions standards d'analyse d'échantillons transférés sur membrane PVDF. L'analyse et l'identification ont été faites par chromatographie microbore en ligne, en phase-reverse (140C Microgradient System, Applied Biosystems) avec détection UV à 269 nm et calculs par le logiciel 610A (Applied Biosystems).

#### **VII- Western blot**

Les protéines ont été préparées dans un tampon Laemmli (Tris 62,5mM pH 6, 25% Glycérol, 5% β-mercaptoéthanol, 2% SDS, 0,01% bleu de bromophénol) puis déposées sur gels d'acrylamide 12,5%. Après migration, les protéines ont été électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose (Millipore), 100 V pendant 1heure. La membrane a été ensuite saturée dans une solution de TBS (NaCl 125 mM, Tris-HCl 25mM pH8, 0.1% de Tween) contenant 5% de lait en poudre pendant une heure à température ambiante, puis incubée toute la nuit sous agitation à 4°C avec des anticorps primaires spécifiques (**Tableau 2**). Les membranes ont ensuite été hybridées une heure et demi avec un anticorps secondaire, de lapin ou de souris, couplé à l'HRP (Southwestern). La liaison anticorps-antigène a été détectée par chimioluminescence (ECL, GE Healthcare). La révélation a été réalisée sur des films photographiques (GE Healthcare) qui ont été scannés au moyen d'un densitomètre BioRad GS800. Les signaux ont été exploités en utilisant le logiciel Quantity One Version 4.4 (BioRad).

#### **VIII- Digestion d'ANXA1 recombinante**

##### **1) Par la fraction membranaire et le milieu conditionné des cellules A375**

Les protéines membranaires et sécrétées obtenues à partir de  $5.10^6$  cellules A375 ont été incubées pendant une heure à 37°C avec 75 ng d'ANXA1 recombinante portant un tag histidine dans sa partie C-terminale (R&D). Le volume réactionnel étant de 150 µL, un



volume équivalent de tampon de lavage/fixation 2X (**Tableau 3**) contenant 40 ng de billes magnétiques (Life Technology) a été ajouté. Pour une fixation efficace d'ANXA1 par son tag sur les billes, le mélange a été incubé sous agitation pendant quinze minutes. Par l'intermédiaire d'un support magnétique, les billes ont été récupérées puis lavées quatre fois avec le tampon de lavage/fixation. ANXA1 recombinante a ensuite été éluée par un tampon d'éluion (**Tableau 3**). Le clivage d'ANXA1 a été ensuite analysé par Western blot.

2) Après séparation des protéines membranaires par SDS/PAGE

Cinquante µg de protéines membranaires des cellules A375 ont été séparées par SDS/PAGE. Après migration, le gel a été incubé dans un tampon de renaturation (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl et 2.5 % Triton X-100) pendant 90 minutes puis lavé 15 minutes avec de l'eau milliQ. Le gel a été ensuite coupé horizontalement en 21 pièces. Chaque pièce de gel a été incubée pendant 24 heures à 4°C puis 24 heures à 37°C avec 50 ng d'ANXA1 recombinante dans 50 µL d'une solution contenant 50 mM tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl et 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Le clivage d'ANXA1 a ensuite été analysé par Western blot.



# **RESULTATS**

# **ET**

# **DISCUSSIONS**



Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont été regroupés en 2 parties :

- La première partie présente d'une part l'évaluation de la valeur pronostique d'ANXA1 dans la dissémination du mélanome dans des biopsies de patients. D'autre part, elle présente des travaux montrant le rôle et le mode d'action d'ANXA1, à l'échelle moléculaire, dans les processus d'invasion. Ces travaux sont rédigés dans une publication soumise à *Pigment Cell & Melanoma Research*.

- La deuxième partie porte sur l'analyse de l'expression des annexines dans des xénogreffes de mélanomes humains et la caractérisation du clivage d'ANXA1 dans la lignée A375.





## **Partie I: Implication de l'annexine A1 dans l'invasion du mélanome cutané**

### **I- Introduction**

Le mélanome cutané est un cancer très agressif qui se développe à partir de mélanocytes présents dans l'épiderme au cours d'une première phase appelée RGP, avant d'acquérir des capacités invasives lui permettant de dégrader la JDP et d'envahir le derme pendant la phase appelée VGP. Cette phase de transition RGP-VGP est l'étape qui conditionne le risque métastatique. Le mauvais pronostic en termes de survie des patients porteurs de mélanome cutané est dû au manque de thérapie efficace sur la maladie disséminée. La mesure de l'indice de Breslow (épaisseur de la tumeur primitive), dont découlent les choix thérapeutiques, est le seul marqueur pronostique existant du mélanome cutané. S'il a une valeur statistique, il souffre souvent à l'échelon individuel d'un manque de spécificité. Ainsi pour certaines tumeurs de faible épaisseur, donc avec un pronostic *a priori* favorable, des tumeurs secondaires très agressives peuvent apparaître et se développer rapidement. Cela souligne le besoin urgent d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques associés à la transition RGP-VGP, pour une meilleure prédiction du devenir des malades et une meilleure prise en charge thérapeutique.

Dans le laboratoire, il a été identifié, dans le modèle syngénique de mélanome B16 chez la souris C57Bl6 des protéines différentielles potentiellement associées au processus de dissémination. Parmi celles-ci, ANXA1 joue un rôle promoteur dans l'invasion des cellules B16 métastatiques (194). L'objectif de cette étude a été de valider les données obtenues sur les modèles murins dans des échantillons humains et d'identifier le mécanisme d'action d'ANXA1 dans l'invasion du mélanome cutané, en particulier les voies de signalisation qu'elle mobilise.



**II- « ANXA1 in primary tumours promotes melanoma dissemination »**

**Zied Boudhraa<sup>\*1</sup>, Fabien Rondepierre<sup>\*1</sup>, Lemlih Ouchchane<sup>2</sup>, Roselyne Kintossou<sup>3</sup>, Anna Trzeciakiewicz<sup>1</sup>, Frederic Franck<sup>4</sup>, Jean Kanitakis<sup>5</sup>, Bruno Labeille<sup>6</sup>, Juliette Joubert-Zakeyh<sup>4</sup>, Bernadette Bouchon<sup>1</sup>, Jean Luc Perrot<sup>6</sup>, Sandrine Mansard<sup>3</sup>, Janine Papon<sup>1</sup>, Pierre Dechelotte<sup>4</sup>, Jean-Michel Chezal<sup>1</sup>, Elisabeth Miot-Noirault<sup>1</sup>, Mathilde Bonnet<sup>1</sup>, Michel D'Incan<sup>1,3</sup>, Françoise Degoul<sup>1</sup>**

**\*: ZB and FR contribute equally to this work.**

<sup>1</sup> UMR Inserm 990, Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée, Université d'Auvergne, BP 184, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup> Department of Biostatistics, Université d'Auvergne, F-63001 Clermont-Ferrand

<sup>3</sup> Department of Dermatology, CHU, Université d'Auvergne, F-63001 Clermont-Ferrand

<sup>4</sup> Department of Pathology, CHU, Université d'Auvergne, F-63001 Clermont-Ferrand

<sup>5</sup> Department of Dermatopathology, Edouard Herriot Hospital Group, F-69437 Lyon cedex 03

<sup>6</sup> Department of Dermatopathology, CHU St-Etienne, F-42055 St-Priest-en-Jarez.

Running title: Annexin A1 enhances melanoma dissemination

**Corresponding author:**

Françoise Degoul

UMR, Inserm 990 – Université d'Auvergne

58 rue Montalembert, BP184,

Clermont-Ferrand 63005, France

Tel: +33 4 73 15 08 14

Fax: +33 4 73 15 08 01

e-mail: francoise.degoul@inserm.fr



## **Abstract**

Metastatic melanoma is among the most aggressive forms of skin cancers and has a poor prognosis. We previously identified Annexin A1 (ANXA1) as a potential murin melanoma spreading factor which could modulate cell invasion by binding to formyl peptide receptors (FPRs). Here, we report that 1) in a B16Bl6 spontaneous metastasis model, a siRNA-induced decrease in tumoural ANXA1 expression gave rise to a significant reduction in lung metastase occurrence; 2) in a retrospective study of 61 patients, the metastasis free survival was inversely related to ANXA1 level expression in primary tumours (HR 3.15,[1.03-9.69], p=0.045); 3) in human melanoma cell lines, ANXA1 content positively correlated with their *in vitro* invasion capacities while normal melanocytes exhibited low ANXA1 levels; 4) ANXA1 N-terminal peptide significantly stimulated *in vitro* invasion of melanomas by acting on FPRs, 5) FPR/ANXA1 interaction induced MMP2 activation via MAP Kinase and STAT3 pathways and 6) MMP2 activity was also decreased in ANXA1 siRNA B16Bl6 tumours compared to control siRNA ones. These findings identify ANXA1 as a melanoma proinvasive protein that could be a promising prognosis marker and therapeutic target.

**Keywords:** Annexin A1, Formyl Peptide Receptors, Melanoma, Metastases.

**Running title:** ANXA1, an actor in melanoma aggressiveness



## **Introduction**

Melanoma dissemination is a complex process characterised by specific gene deregulations or mutations that modify their shape, proliferation and their migratory and invasion properties [1-3]. Among the deregulated pathways involved in proliferation, an activating mutation in BRAF plays an important role in melanoma progression [4,5]. Specific inhibitors of this mutated isoform have yielded promising results on disseminated melanoma [6], but some resistance mechanisms occur as a result of associated with Ras mutation or an antagonist role of CRAF [7,8]. In light of this, targeting different pathways could be considered as a means of decreasing melanoma progression. We identified proteins associated with melanoma aggressiveness that could be useful for the follow up of patients and/or as therapeutic targets. Among them, annexin A1 (ANXA1) is a potential melanoma-spreading factor [9]. ANXA1 was first described as an anti-inflammatory protein acting mainly through phospholipase A2 inhibition [10]. ANXA1 also plays several roles in cell proliferation and differentiation, apoptosis, protein trafficking, and membrane fusion [11]. Although many studies have implicated ANXA1 in carcinogenesis, its role remains controversial. In urothelial carcinoma [12], glioma [13], colon carcinoma [14] and lung squamous carcinoma [15] high ANXA1 expression rate correlated with tumour progression. In contrast, decreased expression was observed during prostate, oral and gastric cancer progression [16-18]. Breast cancer is the most striking example since both decreases and increases in ANXA1 steady state level have been observed [19-22]. Thus, ANXA1 may be involved in cancer progression in a cell-type-specific manner. In addition, ANXA1 may have different subcellular localizations that could determine its function [11]. For example, extracellular form plays a specific role in immune cell migration [23] but also in cancerous cell invasion processes [9,24]. This ANXA1 proinvasive effect is triggered by interaction of its N-terminal part (ANXA1<sub>1-26</sub>) with the formyl peptide receptors (FPRs) [9,24,25]. ANXA1<sub>1-26</sub> has a greater affinity for type 1 in mice (FPR1) and type 2 in humans (FPR2) [26,27]. FPRs were first observed in the immune system as playing a major role in neutrophil chemoattraction caused by formylated bacterial peptides in inflammatory sites [28]. Interestingly, the expression of these receptors has been associated with glioblastoma (Huang et al., 2008; Zhou et al., 2005) and melanoma aggressiveness [29-31]. In this report, we investigated the relation between ANXA1





expression and metastatic capacity in murine melanomas and in human melanoma biopsies. We also investigated at the molecular level the pathways induced by ANXA1 (ANXA1<sub>2-26</sub>) that conferred an invasive phenotype on human melanoma cell lines.



## **Material and methods**

### **Materials**

Scramble peptide Ac-YESQFKAVWVEINTQQMLKFEAEV, human ANXA1<sub>2-26</sub> Ac-AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK and mouse ANXA1<sub>2-26</sub> Ac-AMVSEFLKQARFLENQEYVQAKV were synthesized by Genecust (Dudelange, Luxembourg), fMLP (FPR agonist) by Sigma-Aldrich (Lyon, France) and tBoc (FPR antagonist) by Phoenix Pharmaceuticals (Strasbourg, France). PD98059, SB203580 and S31-201 were purchased from Calbiochem (Merck Millipore, France). P-ERK ½ (Thr202/Tyr204), p-STAT3 (Tyr 705), p-STAT3 (Ser727), p-JNK (Thr 183/Tyr 185) and p-p38 (Thr180/Tyr182) antibodies were purchased from Cell Signalling (Ozyme, St-Quentin en Yvelines, France). Annexin A1 (clone H65 for mouse cells and clone EH17a for human cells), GAPDH (FL-335) and FPRs (H-230) antibodies were purchased from Santa Cruz (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). Annexin A1 antibody for IHC was from Pharmingen (BD Biosciences, Le Pont De Claix, France.)

### **Cell lines**

Mouse melanoma B16Bl6 cells were from the laboratory of Pr Fidler (Texas University, Houston, USA) and B16F10 cells and human melanoma A375, SK-MEL-3 and WM1552C cells from ATCC. M4Beu and M3Dau cells were a kind gift from Dr Doré (Inserm, Lyon, France) and Lu1205 cells from Professor Larue (Institut Curie, Paris, France). B16, A375, SK-MEL3, M3Dau and M4Beu were cultured under conditions described elsewhere [9,32]. For WM1552C we used MW489 composed of 25% Leibovitch (Invitrogen) and 75% MCDB153 (Sigma-Aldrich) media supplemented with 4% FCS. Melanocytes were purchased

from Cascade Biologics (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and maintained in complete 154-CF medium (Cascade Biologics, Tebu-Bio, LePerray en Yvelines, France). Invasion experiments were carried out in OPTIMEM (Invitrogen) supplemented with 900 µM CaCl<sub>2</sub>.



### **Invasion assay**

Inserts (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) were coated with 5 µg Matrigel (BD Biosciences) overnight and seeded with  $2 \times 10^5$  cells in 500 µL supplemented OPTIMEM. For B16Bl6 and human melanoma cell lines stimulated with scramble (10µM), ANXA1<sub>2-26</sub> (10µM), fMLP (10µM) or tBoc (30µM) peptides, invasion assays were stopped after 24 and 6 h, respectively. Inserts were placed in 24 well plates containing 750 µL supplemented DMEM for 24 h. Invading cells were then fixed in methanol and coloured by Crystal Violet. Each invasion assay was performed in duplicate at least three times.

### **qRT-PCR analyses**

Total RNA from human melanoma cells were isolated using the NucleoSpin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Total RNA concentration and purity were measured with a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). RNA integrity was checked using 1% agarose gel. Reverse Transcription of RNA was performed from 500 ng RNA, using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) was used to quantify gene expression by real-time polymerase chain reaction (PCR). The PCR (program: 95°C–30 s; 40 cycles: 95°C–5 s; 60°C (26S, FPR1) or 62°C (FPR2)–35 s) was performed using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The relative standard curve method was applied to calculate relative gene

expression of FPR1 and FPR2. Target gene expression was normalized to the housekeeping gene 26S.

The primers used for PCR are listed below:

FPR1 For : 5'CCTTCTGCAGAGGTGGAGTT3',

FPR1 Rev : 5'CAAATCAGGGGACACAAAGG3',

FPR2 For : 5'AGCGCATAATAAGGGGAAGA3',



FPR2 Rev : 5'TGATAAAATGCAAAGTCCACTCA3'

FPR3 Fo : 5'CAGGCTGTCTGATTCCATCTT3',

FPR3 Rev : TTTCCATCTTCCCACACCAC3'

26S For : 5' CGCAGCAGTCAGGGACAT3',

26S Rev : 5'AGCACCCGCAGGTCTAAATC3'

### **Western blot analyses**

For MAPK kinase and STAT3 pathway activation studies, M3Dau, A375 and WM1552c cells were seeded in 6-well plates ( $2 \cdot 10^5$  cells/well) and incubated with ANXA1<sub>2-26</sub> (10 $\mu$ M), fMLP (10 $\mu$ M) or tBoc (30 $\mu$ M) for 10 minutes. Cells were lysed by RIPA buffer containing phosphatase and protease inhibitors.

Whole cell lysates were subjected to Bradford assay for protein quantification. 25-50  $\mu$ g of proteins were separated onto 12.5% SDS-PAGE and transferred onto Nitrocellulose membranes (Millipore). Blots were then probed with the indicated primary antibodies overnight at 4°C followed by HRP conjugated secondary antibody (Southwestern, Clinisciences, France) for 2 hours at room temperature for chemiluminescence detection

(Amersham, GE Healthcare, Orsay, France). Films were scanned using a calibrated BioRad GS 800 densitometer and analyzed with Quantity One software (BioRad, Marnes la Coquette, France).

### **Determination of MMP2 activity by zymography**

#### Sample preparation:

For tumours, protein extraction was performed with Gentle Mac Dissociator (Miltenyi Biotec) in a buffer containing 10 mM HEPES and 100 mM NaCl. Extracts were cleared by





centrifugation (10 min, 12000g) and subjected to Bradford assay for protein quantification. 50 µg of each extract were analysed.

For cell analyses, cells were seeded in 6 well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well) and incubated for 6 hours with peptides. Following incubation, conditioned media were collected and concentrated using Vivaspin 500 microconcentrators with a cut off size of 5 KDa (Sartorius Stedim, Aubagne, France).

For studies including S31-201, PD98059 and SB203580 inhibitors (specific inhibitors of STAT3, MEK and p38 respectively), M3Dau, A375 and WM1552c cells were pretreated 14 hours with S31-201 (150µM) and 1 hour with PD98059 (10µM) or with SB203580 (10µM) before peptide stimulation.

#### Gelatin Zymography:

Samples were prepared with SDS sample buffer and subjected to 0.1% gelatin-10% SDS-PAGE electrophoresis. After electrophoresis, gels were washed twice for 30 minutes with 2.5% triton X100 and incubated 24 hours at 37°C in 50mM tris buffer containing 200mM NaCl and 5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4. The gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

#### **Mouse metastasis studies**

Studies were performed in accordance with French and EU guidelines for care of laboratory animals (agreement number, CE 33-11,CEMEA Auvergne). Syngeneic tumours and metastases were obtained after subcutaneous injection of B16Bl6 cells ( $3 \times 10^5$  cells per mouse) into the flank of C57BL6 mice (Charles River, L'Arbresle, France) (n=10 per group). Three siRNA were tested for their ability to decrease the level of ANXA1 protein, the most efficient one which had been used previously for *in vitro studies* [9] was selected for *in vivo* study (data not shown). Mouse siRNA treatment consisted in three intratumoural injections of ANXA1 or control siRNA at days 11, 14 and 18 after tumour graft. Treatments were 300 pmol of siRNA and 15 µg of lipofectamin in 50 µL of physiological serum. Mice were sacrificed at 23 days after cell graft. Metastases were counted in each lung. During all the treatments, tumour volume was measured as previously described [9]. This experiment was done twice with 10 mice per group, one and 2 mice deceased in Control siRNA and ANXA1

Clermont-Fd /St-Etienne	27/34
Age at diagnosis (yrs) (m±SD)	48,4 ± 16,2
Female (%)	37 (61%)
SSM/Nodular/ALM	31/23/5 *
Breslow index , mm (m±SD)	2,1 ± 1,9
<u>UICC Stages</u>	
T1AN0/T1BN0,	13/5
T2AN0/T2AN1A/T2BN0/T2BN1B	18/1/6/1
T3AN0/T3AN2B/T3BN0	7/1/2
T4AN0	7
Death, n (%) :	14 (23%)
Delay from diagnosis, mths (m±SD)	71,8 ± 36,5
Metastases,n (%) :	18 (29,5%)
Delay from diagnosis, mths (m±SD)	51,7 ± 37,6
<u>Melanoma primary site location</u>	
Face/Back&Trunk/Upper limbs/Lower limbs	1/11/11/30**
<u>Melanoma metastases location</u>	
Local /Regional Lymph Node/ Visceral	11/13/12
Follow up (years)	11,6 ± 4

\*: 2 missing data \*\*: 8 missing data

. SSM: Superficial Spreading Melanoma, ALM: Acral Lentiginous Melanoma

**Table1: Patient characteristics and clinical data**

siRNA conditions respectively. Numbering of metastases was then performed on 19 and 18 mice respectively; tumoural growth was however calculated on 10 mice for each group, as death occurred at day 21 in both experiments, and the mean value of one of the two experiments was presented for each group.

### **ANXA1 Immunohistochemistry (IHC)**

ANXA1 expression was evaluated on paraffin-embedded primary tumours with an Annexin A1 antibody (BD Biosciences Pharmingen) previously used in immunohistochemical reports [12,33,34]. We studied biopsies from 61 patients whose melanoma was diagnosed between 1991 and 2002, extracted from the databases of the pathological departments of Clermont-Ferrand and Saint-Etienne University Hospitals (France). Data concerning patient evolution, date of first metastasis and date of death if it occurred were collected on 2011. Characteristics of this patient cohort did not differ from data commonly reported elsewhere for melanoma (Table 1). The project was approved by the local ethics committee (AU765). Immunostaining was performed with the ultra View Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Ventana kit on the automaton Benchmark XT Ventana (Tucson, USA). The interpretation of immunostaining was carried out independently and blind to the patients' history by two specialists (FF and JJ-Z).

### **Statistical analyses**

In all experiments, data from three independent experiments were analysed by Student's t-test and are given as mean  $\pm$  SEM. For results expressed as a percentage, statistical analyses were performed on initial values. In all cases,  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant.

Metastasis free survival (MFS) and death specific survival (DFS) were determined with a time-to-event analysis carried out by computing time to these occurrences from the date of melanoma diagnosis. For both metastasis and death, patients who did not experience the event at the end of follow-up were considered as right-censored observations. Time-to-event distributions were estimated using the Kaplan–Meier method and log-rank homogeneity tests were carried out. To assess the possible prognostic effect of age, gender, Breslow index, UICC stage and ANXA1 labeling, Cox proportional hazards models were fitted for each event



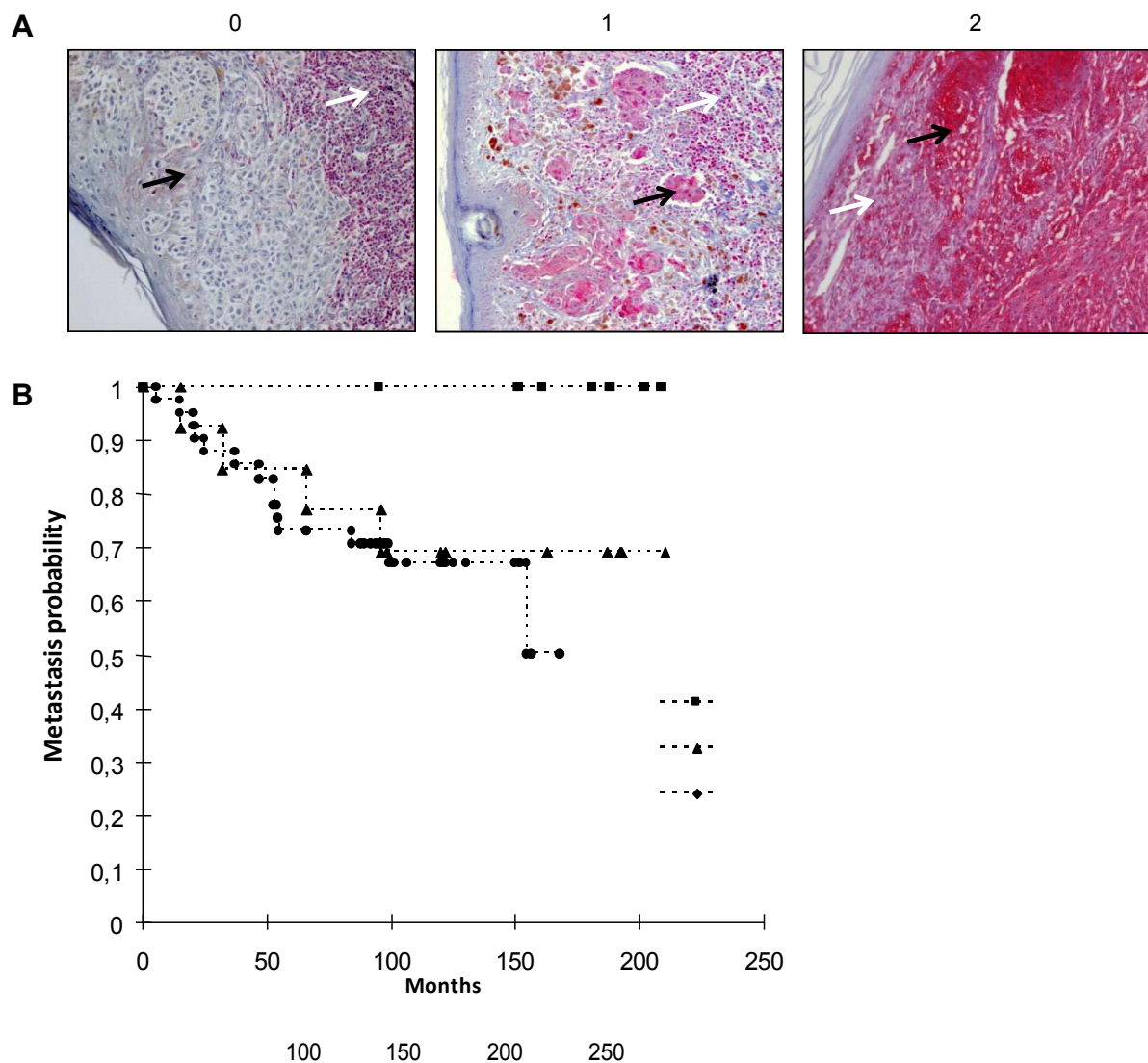
to compute both crude (univariate) and adjusted (multivariate) hazard ratios (HR) of each covariate with their corresponding 95% confidence limits. We carried-out an automatic backward elimination procedure to keep in models only variables with corresponding p-values under 0.2. As the study involved two centers, multivariate analysis was adjusted on centre, age, sex and Breslow index that were forced to stay in models. For the purpose of interpretation, some covariates were included as recoded variables: for age, we separated patients under 50 years from those of 50 and over, and for Breslow index, we separated melanomas under 1.5 mm from those of 1.5 mm and over. We defined ANXA1 labeling as an ordinal variable coded 0 when no tumoural cell was labeled, 1 when less than 50% of cells were labeled and 2 otherwise (from 50% to 100% of labeled cells). For computational reasons ANXA1 labeling was introduced as a quantitative covariate. UICC stage was introduced in analyses with two separated variables, *i.e.*, tumor (1, 2, 3 or 4) and node (separating 0 from non-zero) stages. All the analyses were performed using SAS v9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with a type I error set to 0.05 for most analyses.

## Results

### **ANXA1 modulated in vitro and in vivo B16Bl6 melanoma invasion**

To analyse the effect of extracellular ANXA1 on the invasion of mouse melanoma cells, B16Bl6 cells were treated with the ANXA1 N-terminal-derived-peptide mimetic (ANXA1<sub>2-26</sub>) and subjected to invasion assay. Matrigel coated chamber tests showed that ANXA1<sub>2-26</sub> treatment significantly increased the number of invading cells (Student's t test,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1A). The same result was previously obtained with FPR agonist (fMLP) whereas a decrease in invasion was observed under ANXA1 siRNA treatment [9].

We then determined *in vivo* whether ANXA1 down regulation decreases tumorigenicity in the syngenic B16Bl6 melanoma model. Mice received three injections of control or ANXA1 siRNA at days 11, 14 and 18 after tumour graft. The decrease of ANXA1 expression in primary tumours was assessed by western blot (Supplementary Fig. 1A). This intratumoural treatment led to a significant reduction in lung metastases in mice receiving ANXA1 siRNA treatment with a median of 3 vs 12 metastases per animal (Student's t test,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1B),



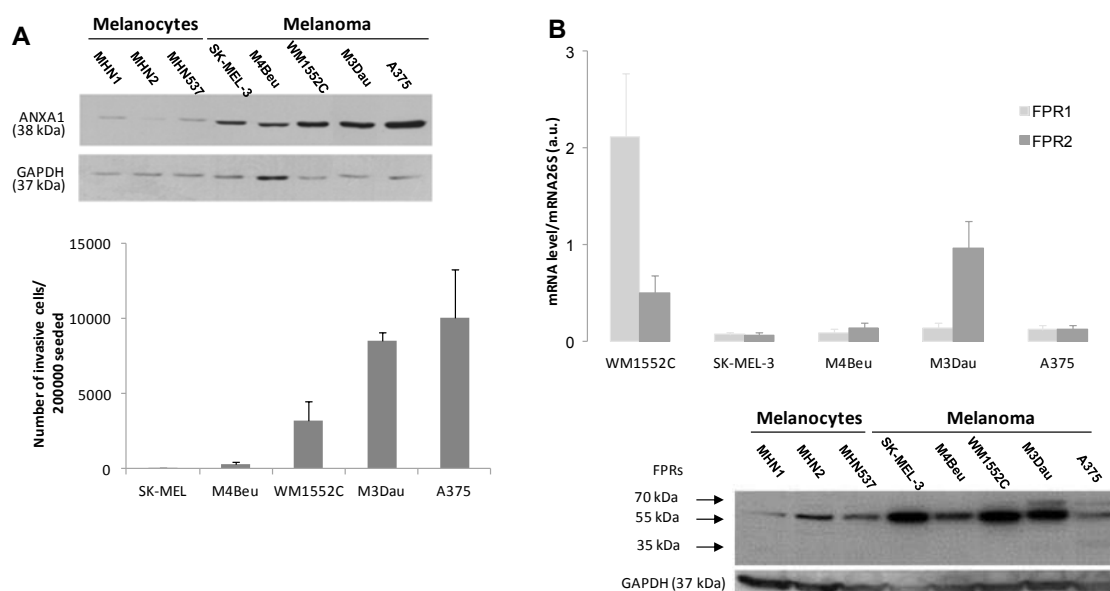
**Fig. 2: High ANXA1 expression in human primary tumours reduced metastasis free survival**  
 (A) ANXA1 labelling (red) in primary melanoma biopsies was classified into three groups: no labelling (0), <50% of cells were labelled (1), >50% of cells were labelled (2) (X200). ANXA1 was detected immunohistochemically with an Annexin A1 antibody (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) and alkaline phosphatase red kit (Ventana, Tucson, USA). ANXA1 expression is mainly cytoplasmic in melanoma cells. The white arrows indicate lymphoid cells and black arrows tumour areas. (B) Kaplan Meier representations of patient metastasis free survival in relation to ANXA1 intensity labelling described in (A). The time to metastases was expressed in months from the time of diagnosis, stratified in patient groups characterised by increasing ANXA1 expression levels: no labelling (0, square), labelling <50% (1, triangle) and >50% (2, diamond).

without changing either tumour growth (Fig. 1C) or cell proliferation as assessed by PCNA expression analysis (data not shown).

### **Human primary melanoma ANXA1 content was negatively associated with the time to metastasis**

To assess the contribution of ANXA1 to the occurrence of melanoma metastases, its expression was investigated in human primary tumours from two French hospitals, the clinical data are reported in Table 1. ANXA1 was expressed in 54/61 biopsies, localized in tumoural melanocytes with, in most cases, a cytoplasmic pattern (black arrows, Fig. 2A). Extra-tumoural staining was also observed, in lymphoid cells (white arrows, Figure 2A). For statistical analysis, we considered ANXA1 amount as an ordinal variable, coded 0 when no tumoural cell was labelled, 1 when less than 50% of tumoural cells were labelled and 2 otherwise. In these three classes, the mean  $\pm$  SD of Breslow index was  $0.85 \pm 0.20$  mm (n=7),  $1.90 \pm 0.33$  mm (n=13) and  $2.38 \pm 0.34$  mm (n=41) for 0, 1 and 2 ANXA1 labelling staining respectively. ANXA1 labelling increased in relation to tumour thickness but this variation was not statistically significant (global F (2,58) statistic = 2.07, p = 0.1355). We assessed the impact of different parameters on Disease Specific Survival (DSS). As expected, melanoma thickness was statistically correlated with a reduction in DSS (HR 13.81[1.78-106.97], p=0.012) but ANXA1 expression, age and sex did not (data not shown). Similar results were found in the univariate analyses for time to metastasis with a high prognostic impact of tumour thickness on Metastasis Free Survival (MFS) (HR 23.21 [3.09-174.94], p=0.002). The Kaplan-Meier graph of MFS was represented according to the three previously defined ANXA1 intensities 0, 1 and 2 (Fig. 2B). However, the combination of the parameters in multivariate analyses showed that changes in ANXA1 expression (from 0 to 1 and from 1 to 2) significantly increased the risk of developing metastases (HR 3.15,[1.03-9.69], p=0.045) (Table 2). This multivariate analysis excluded the UICC stage, decomposed in two variables (tumor and node stages) for MFS risk (see Material and methods section).





**Fig. 3: Expression of ANXA1 and FPR in human melanocytes and melanoma cell lines**

(A) Immunoblots of human melanocytes and melanoma extracts for ANXA1 expression (upper panel) indicated that melanocytes expressed a low ANXA1 level compared to that of melanoma cells. The number of invading cells was determined in three Matrigel coated chamber experiments. Different invasion capacities were observed according to melanoma cell lines (lower panel). (B) Relative gene expression of FPR1 and FPR2 in human melanoma cell lines as calculated using the relative standard curve method. FPR2 expression was higher than FPR1 in all tested melanoma cultures. Results of gene expression were normalized to the housekeeping gene 26S. PCR efficiency and target cDNA quantification were determined with standard curves obtained with a 10-fold serial dilution of FPR1 and FPR2 transfected HL60 cDNA, and normalization was performed with the expression of 26S (upper panel). Detection by Western blots of FPRs in melanocytes and in different melanoma cell lines using an antibody recognizing a peptide in common between FPR1 and FPR2 (lower panel).

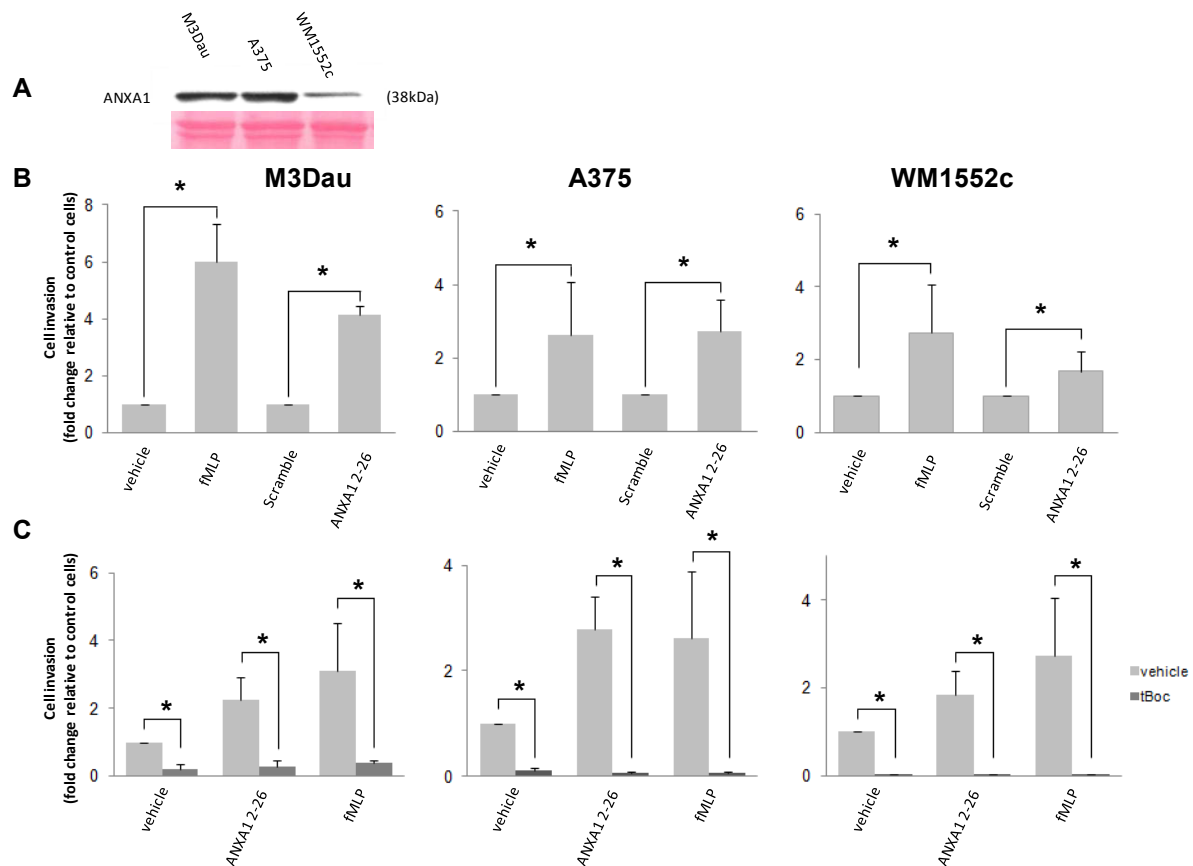
Time to metastasis	HR	95%CL	p-value
Clermont-Fd Hospital	2,97	[0,98-9,04]	0,055
age>50 years	1,06	[0,39-2,85]	0,908
male	0,6	[0,2-1,81]	0,366
breslow>1.5 mm	24,27	[3,12-188,88]	0,002
ANXA1 labeling	3,15	[1,03-9,69]	0,045

**Table 2: Multivariate analysis for time to metastasis (MFS)**

Multivariate analysis was performed by backward elimination procedure to keep in models only variables with corresponding p-values under 0.2 and was adjusted on center, age, sex and Breslow index that were forced to stay in models. UICC stage (decomposed in two variables) did not stay in the model.

### **ANXA1 and FPRs expressions were significantly higher in human aggressive melanoma cell lines**

ANXA1 expression was investigated in normal human melanocytes and melanomas. Normal melanocytes expressed low ANXA1 level than melanoma cells, which exhibit various ANXA1 levels (Figure 3A, upper) and possess different abilities to invade matrigel (Fig. 3A, lower). A Pearson correlation test revealed a significant correlation between ANXA1 amount and the invasive ability of human melanoma cells ( $r^2 = 0.7988$ ,  $p = 0.041$ ). We then examined by qRT-PCR and Western blot the presence of FPRs in different melanoma cell lines. qRT-PCR analysis (Fig. 3B, upper) showed that all tested cells expressed FPR1 and FPR2 (FPR3 could not be detected). After normalisation by 26S, we observed a higher expression of FPR1 in WM1552C than in other cell lines. Greatest FPR2 expression was observed in M3Dau. Western Blot analysis using a polyclonal anti-FPRs antibody (Fig. 3B, lower) showed that melanoma cell lines expressed higher levels of FPRs than melanocytes. In line with previous observations, FPRs displayed a higher apparent molecular weight (50 to 70 Kda) than native receptors (38 Kda), owing to FPRs N- glycosylation [35].



**Fig. 4: hANXA1<sub>2-26</sub> peptide enhanced *in vitro* melanoma invasion through FPR**

(A) ANXA1 expression in M3Dau, A375 and WM1552c extracellular extracts indicating its presence in cell culture supernatants. (B and C) Different melanoma cell lines, M3Dau (left), A375 (middle) and WM1552c (right), were submitted to Matrigel coated chambers in the presence of hANXA1<sub>2-26</sub> peptide, FPR agonist (fMLP) and/or antagonist (tBoc) for 6h. The percentage of invasive cells was determined in three experiments. They showed a significant increase in cell invasion in presence of fMLP, hANXA1<sub>2-26</sub> peptide (B) and a decrease when tBoc was added (C) (\* Student's t test,  $p < 0.05$ ).

### **hANXA1<sub>2-26</sub> promoted *in vitro* melanoma invasion through FPRs and MMP2 activation**

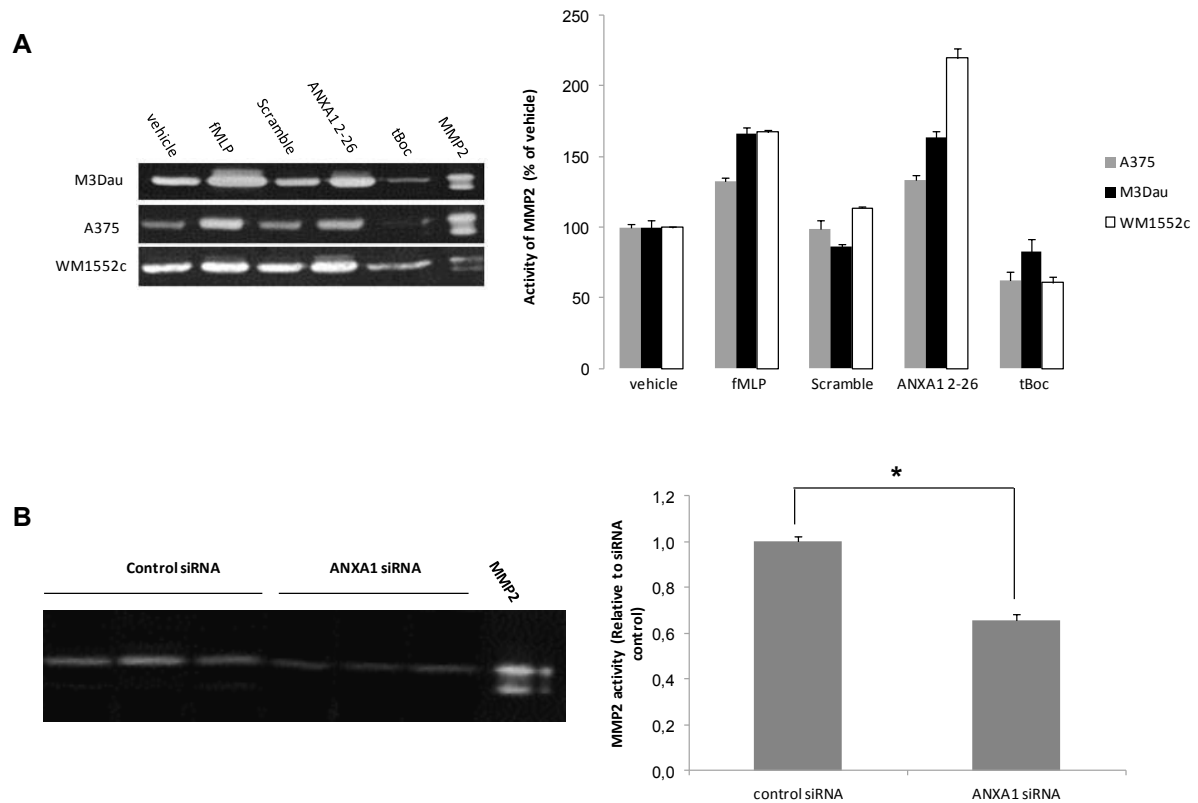
To study ANXA1/FPR axis functionality we selected A375, M3Dau and WM1552c cell lines, which exhibit higher levels of ANXA1 and expressed FPRs. We first investigated whether these cell lines released ANXA1. ANXA1 was readily detectable in the supernatant of cultured cells (Fig. 4A) in similar amounts to those within the respective cells.

To determine whether FPRs were functional, selected cell lines were incubated either with fMLP or with human ANXA1<sub>2-26</sub> peptide and subjected to Matrigel coated Boyden chamber invasion assay. In the presence of fMLP, we observed a significant increase in the number of cells able to invade Matrigel (Student's *t* test,  $p < 0.05$ ) (Fig. 4 B). However, tBoc, an FPR antagonist, abrogated this stimulation (Student's *t* test,  $p < 0.05$ ) (Figure 4 C) demonstrating that FPRs were functional in these cell lines. The same observation was made in the presence of hANXA1<sub>2-26</sub> peptide, which increased the number of invasive M3Dau, A375 and WM1552c cells by 4, 2.7 and 1.7-fold respectively. hANXA1<sub>2-26</sub> peptide conferred a more invasive phenotype to human melanoma cells.

Among all actors implicated in melanoma invasion, we focused our attention on matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP2 and MMP9). Activities were assessed by gelatin zymography in M3Dau, A375 and WM1552 conditioned media. Cells incubated with fMLP and hANXA1<sub>2-26</sub> displayed higher extra cellular MMP2 activity than control cells while tBoc treatment substantially impaired MMP2 basal activity (Fig. 5A). Moreover, tumour grafts treated with ANXA1 siRNA and which presented a decrease in pulmonary metastases number (Fig. 1B) display significantly less MMP2 activity than control ones (Fig. 5B). These findings show that the proinvasive effect of ANXA1 was at least partly due to MMP2 activation.

### **hANXA1<sub>2-26</sub> activated MAP Kinases and STAT3 activation in melanoma cell lines**

We next analysed the signalling pathways that were activated following FPR/ANXA1<sub>2-26</sub> peptide interaction and led to MMP2 activation in A375, M3Dau and WM1552c cell lines. It has been shown that MMP2 activation is tightly and positively regulated by JAK/STAT3 and/or MAPK pathways [36-38]. Since the latter pathways could be induced by FPR activation [39,40], we used Western blotting with the anti-phospho-specific-abs of each enzyme to assess whether fMLP/hANXA1<sub>2-26</sub> treatment stimulated STAT3, ERK, JNK and



**Fig. 5: FPRs/hANXA1<sub>2-26</sub> interaction is followed by an increase in MMP2 activity**

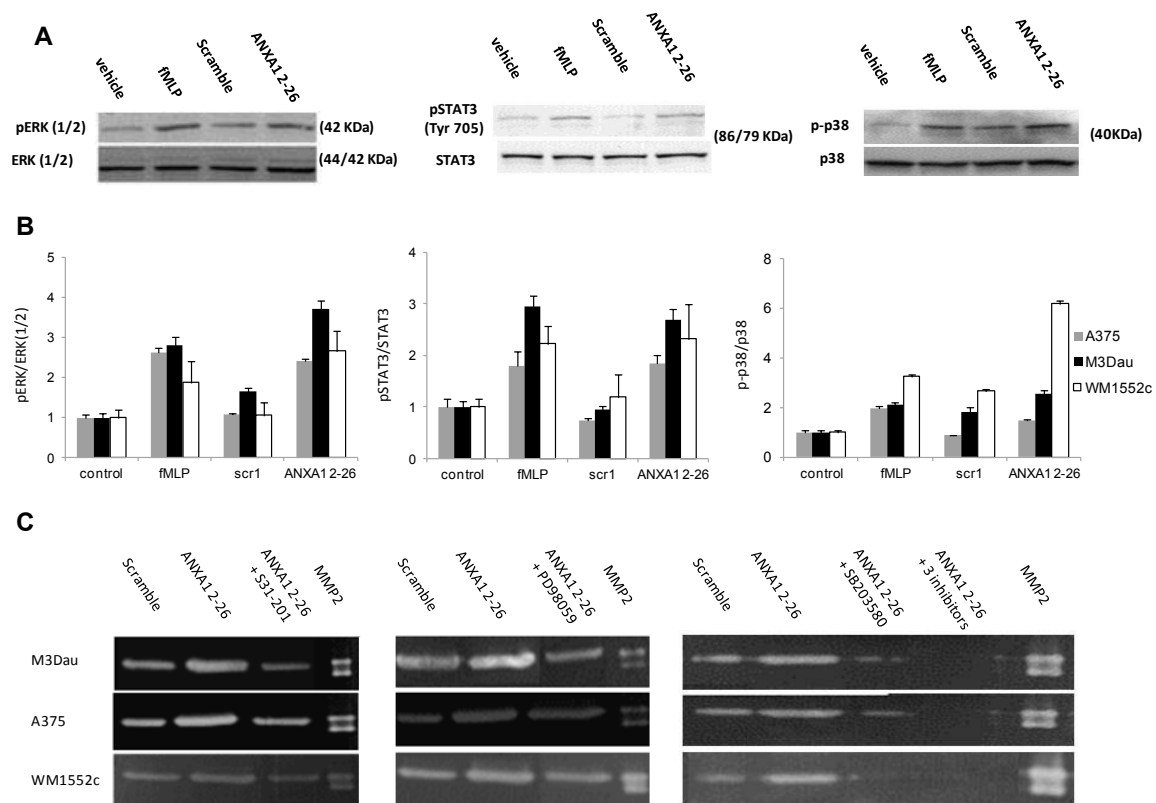
(A) M3Dau, A375 and WM1552c cells were treated with fMLP, ANXA1<sub>2-26</sub> or tBoc peptides for 6 hours. The conditioned media were collected and MMP2 activity was determined using gelatin zymography. The relative histogram shows the quantitative analyses of the intensities of the MMP2 bands from two independent experiments. (B) Protein extracts (50µg) from B16Bl6 tumours treated with control siRNA or ANXA1 siRNA were subjected to gelatin zymography for MMP2 activity determination. Zymogram (left) of three representative extracts for each condition is shown. The relative histogram (right) shows the quantitative analyses of the intensities of the MMP2 bands of 9 control siRNA tumours and 10 ANXA1 siRNA tumours (\* Student's t test,  $p < 0.05$ ).

p38 phosphorylations. For the three cell lines, both fMLP and ANXA1<sub>2-26</sub> FPR agonists increased ERK, p38 and Tyr 705 STAT3 phosphorylation levels (Fig. 6A and Fig. 6B) but no change in Ser 727 STAT3 phosphorylation state was observed (Supplementary Fig. 1B). An increase in Thr183/Tyr185 JNK phosphorylation was observed only in M3Dau cell line. In contrast, A375 and WM1552c showed no phosphorylation signal (Supplementary Fig. 1B).

We then examined the effect of ERK, p38 and STAT3 phosphorylation on MMP2 activity using specific inhibitors for each kinase. As shown in Supplementary Fig. 1C, PD98059, SB203580 and S31-201, impaired respectively ERK, p38 and Tyr 705 STAT3 phosphorylation in M3Dau, A375 and WM1552c cell lines. When these cell lines were treated (Fig. 6C) with S31-201 (left) or PD98059 (middle) or SB203580 (right), and challenged with ANXA1<sub>2-26</sub> peptide, the increase in MMP2 activity induced by ANXA1<sub>2-26</sub> was impaired. Treatment with the three inhibitors together totally inhibited MMP2 activity. Taken together, these results demonstrate the pivotal role of MAPK and JAK/STAT3 pathways in transducing signals of FPRs/ANXA1<sub>2-26</sub> peptide interaction.

## **Discussion**

We previously demonstrated that ANXA1 was involved in murine melanoma dissemination [9]. Here, we reported for the first time a link between ANXA1 content in primary tumours and melanoma dissemination in two *in vivo* situations i) in a preclinical B16Bl6 model, the reduction of tumoural ANXA1 level significantly lowered the number of lung metastases and ii) in a clinical retrospective human study involving 61 patients, the level of ANXA1 labelling was associated with a risk of melanoma recurrence. Interestingly, in the human study, no correlation between ANXA1 labelling intensity and Breslow index was observed, suggesting that proliferation is not the major parameter modified by ANXA1 expression. Results from B16Bl6 model siRNA experiments are in accordance with this observation since decrease in lung metastase number was not associated with changes in tumour proliferation. While proliferation promotes melanoma progression, the presence of slow cycling cells [41] or tumoural initiating cells [42] has a significant impact on the occurrence of metastasis. In contrast, a recent study [43], showed that B16 engrafted tumours grew significantly slower in ANXA1-nul mice than in their wild-type counterparts. The difference with our model could



**Fig. 6: FPRs/hANXA1<sub>2-26</sub>-induced MMP2 activity is mediated by MAP Kinases and STAT3 pathways in melanoma cell lines**

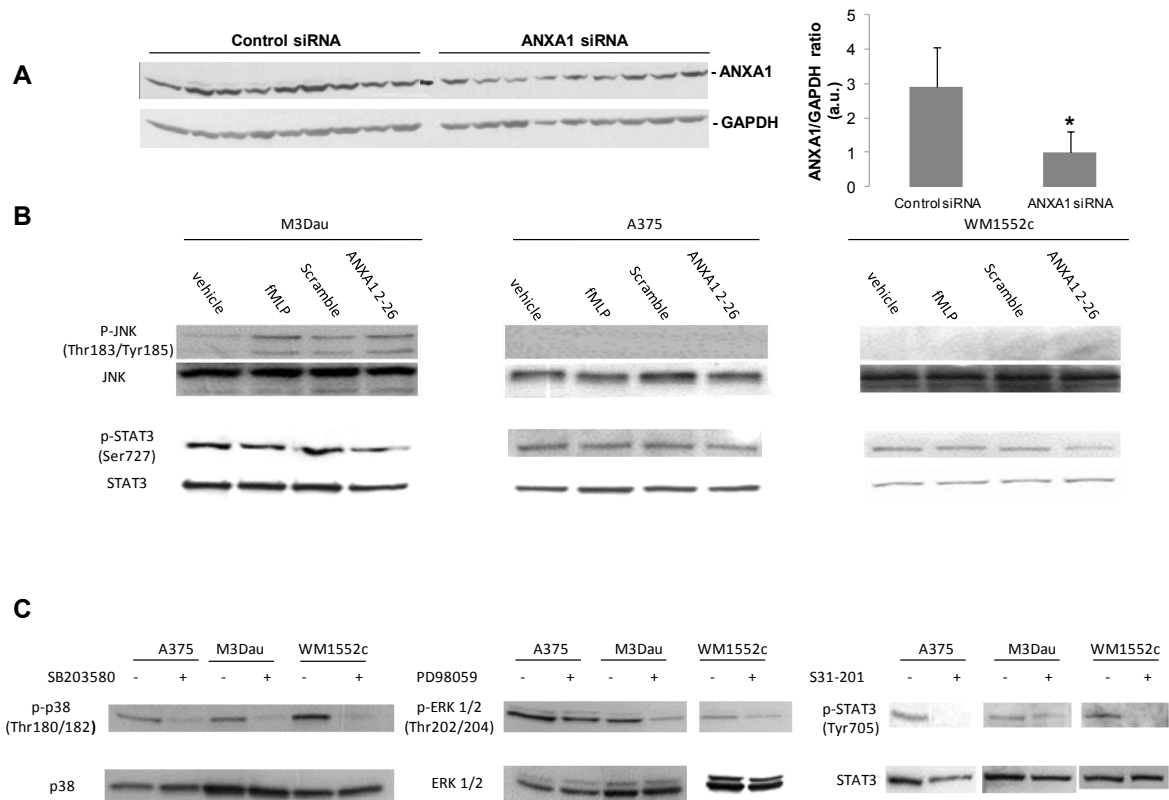
A) M3Dau, A375 and WM1552c cells were stimulated either with hANXA1<sub>2-26</sub> (10 $\mu$ M) or with fMLP (10 $\mu$ M). A representative Western blot using antibodies against p-ERK (Thr202/Tyr204), p-p38 (Thr180/Tyr182) and p-STAT3 (Tyr705) is shown. B) Quantitative analyses of pERK/ERK (left) pSTAT3 (Tyr705)/STAT3 (middle) and p-p38/p38 (right) from three independent experiments demonstrating the stimulation of ERK, p38 and STAT3 pathways in M3Dau, A375 and WM1552c cells by hANXA1<sub>2-26</sub> peptide. C) M3Dau, A375 and WM1552c cells were treated with 150 $\mu$ M of S31-201 overnight and/or 10 $\mu$ M of PD98059 and/or SB203580 for one hour and challenged with hANXA1<sub>2-26</sub> (10  $\mu$ M) for 6 hours. Conditioned media were then subjected to gelatin zymography.

be explained by the presence of residual tumoural and/or stromal ANXA1, which could be sufficient to maintain tumour growth but not the spreading processes.

In this report, we observed the presence of FPRs in human melanoma cells. Using specific agonists (ANXA1<sub>2-26</sub> and fMLP) and an antagonist (tBoc), we showed that these receptors are active and involved in cell invasion processes. Interestingly, FPRs have been implicated in the progression of glioblastoma [30] and it was recently shown that primary melanoma FPR expression correlates with aggressive tumour characteristics [31]. We also observed that FPR mRNAs were present in greater amounts in the metastatic B16Bl6 primary tumours than in a non-metastatic model B16F10, with significant variations in FPR1 (data not shown). In addition, a co-regulation of ANXA1 and FPRs by glucocorticoids has been observed in immune cells [44,45]. Likewise, we observed that FPRs modulated ANXA1 expression [9] and that, conversely, ANXA1 siRNA treatment induced a decrease in FPRs mRNA (data not shown). These findings suggest that it would be of interest in future studies to investigate a possible cross-talk between FPR and ANXA1 expression. We also demonstrated *in vitro* that human melanoma cell lines secreted ANXA1. This finding is consistent with results of a recent *in vivo* study that showed the presence of ANXA1 in extra cellular matrix (ECM) of A375 and MA2 melanoma xenografts [46]. ECM ANXA1 in this report was also mainly secreted by A375 and MA2 tumour cells [46]. We suggest therefore that secreted tumoural ANXA1 could bind to FPR in a paracrine or autocrine manner, amplifying the invasion signals to neighbouring cells.

The invasion process depends not only on tumour cell motility mediated mainly by integrins but also on extracellular proteases such as MMPs, which degrade ECM and also cleave and activate growth factors such as TGF-Beta. In the melanoma cell lines we studied, MMP9 exhibited far weaker activity than MMP2 (data not shown), which is consistent with findings of a previous report on other melanoma cell lines [36]. In the present study, we observe that reduction in ANXA1 expression in B16Bl6 tumours is associated with a decrease of MMP-2 activity and lung metastases number. We also show that extra-cellular hANXA1<sub>2-26</sub> peptide stimulates FPRs to enhance MMP2 activity via JAK/STAT3, ERK and p38 pathways. MAPK pathways has been shown to be involved in the expression of MMPs, indeed ERK regulates the expression of matrix remodelling proteins such as MMPs , urokinase and integrins [47].





### Supplementary Fig. 1

(A) 300 pmol ANXA1 and control siRNA were injected in B16Bl6 tumours at days 11, 14 and 18 which have been obtained after grafting  $3 \times 10^5$  cells into C57BL6 mice. For each treatment, 20 mice were sacrificed at day 23. Proteins were extracted from each tumour. Western blotting analyses revealed a significant decrease in ANXA1 steady state level as quantified by the ANXA1/GAPDH ratio (\* Student's t test,  $p < 0.05$ ). a.u. arbitrary units. (B) M3Dau, A375 and WM1552c cells were stimulated either with ANXA1 2-26 (10  $\mu$ M) or with fMLP (10  $\mu$ M). Protein extracts were then probed by immunoblotting with p-JNK (Thr183/Tyr185) and p-STAT3 (Ser727) antibodies. Incubation with ANXA1 2-26 peptide led to JNK phosphorylation on M3Dau cell line (A375 and WM1552c showed no phosphorylation signal). However, no change in Ser 727 STAT3 phosphorylation state was observed. (C) M3Dau, A375 and WM1552c cells were treated with 150  $\mu$ M of S31-201 overnight or 10  $\mu$ M of PD98059 or SB203580 for 1 hour. Media were then replaced with inhibitor free media for 6 hours before protein extraction and immunoblotting with p-p38 (Thr180/Tyr182), p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) and p-STAT3 (Tyr705) antibodies. In the three studied cell lines, SB203580, PD98059 and S31-201 abrogated, respectively, p38, ERK and STAT3 phosphorylation.

P38 was also involved in melanoma invasion stimulated by a ganglioside through MMP-2 activity increase [48]. It is known that STAT3 becomes activated by JAK-mediated tyrosine phosphorylation of a tyrosine residue (Tyr705) and dimerizes [49]. The dimeric STAT3 translocates to the nucleus, where it binds to consensus STAT3 binding sequences within the promoter region of MMP2 gene and thereby activates its transcription [36]. STAT3 contains a second phosphorylation site (Ser727), which depends on ERK and p38 phosphorylation [50,51]. Once STAT3 is phosphorylated at ser 727 site, transcriptional activity is enhanced [50]. Since no change in the ser 727 STAT3 phosphorylation state was observed, MMP2 activation could occur via two main pathways, JAK/STAT3 (Tyr 705) pathway, and ERK and p38 phosphorylation-dependent pathway. Other human *in vivo* studies have confirmed the involvement of MMP2 in melanoma progression. Indeed, it was shown *in vitro* that MMP2 played a crucial role in melanoma progression since specific inhibition of this protease abrogated melanoma cell invasion [52,53]. Another *in vivo* study on human primary melanoma, suggested that MMP2 expression is linked with poor prognosis in melanoma patients [54]. Further, it has been shown that elevated MMP2 increased the risk of melanoma-specific mortality [55] and that there exists a relation between the expression of MMP2 in primary melanomas and metastases susceptibility [56].

In conclusion, we demonstrate that ANXA1 plays a pivotal role in melanoma dissemination. Our findings could be promisingly used in a large cohort investigation of the prognostic value of ANXA1 and FPR in melanoma metastasis. Inhibiting the interaction between ANXA1 and FPRs in tumours could also have future therapeutic potential.



### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr François Boulay (UMR5092, CEA Grenoble) for the gift of FPR HL-60 cells, Laurie Joumard for her participation in the molecular characterization of melanoma cell lines for FPR status. This work was supported by the Ligue Régionale Contre le Cancer and the Société Française de Dermatologie. ZB was supported by a fellowship from the Innovative funds of Conseil Régional d'Auvergne.



## References

1. Chiang AC, Massague J (2008) Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 359: 2814-2823.
2. Melnikova VO, Bar-Eli M (2009) Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 257-267.
3. Orgaz JL, Sanz-Moreno V (2012) Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 26: 39-57.
4. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954.
5. Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, et al. (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467: 596-599.
6. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, et al. (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364: 2507-2516.
7. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, et al. (2011) Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 140: 209-221.
8. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, et al. (2011) RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*.
9. Rondepierre F, Bouchon B, Papon J, Bonnet-Duquennoy M, Kintossou R, et al. (2009) Proteomic studies of B16 lines: involvement of annexin A1 in melanoma dissemination. *Biochim Biophys Acta* 1794: 61-69.
10. Parente L, Solito E (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res* 53: 125-132.
11. Lim LH, Pervaiz S (2007) Annexin 1: the new face of an old molecule. *Faseb J* 21: 968-975.
12. Li CF, Shen KH, Huang LC, Huang HY, Wang YH, et al. (2010) Annexin-I overexpression is associated with tumour progression and independently predicts inferior disease-specific and metastasis-free survival in urinary bladder urothelial carcinoma. *Pathology* 42: 43-49.
13. Schittenhelm J, Trautmann K, Tabatabai G, Hermann C, Meyermann R, et al. (2009) Comparative analysis of annexin-1 in neuroepithelial tumors shows altered expression with the grade of malignancy but is not associated with survival. *Mod Pathol* 22: 1600-1611.
14. Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED, Mathe EA, Yuen ST, et al. (2009) Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 5878-5887.
15. Nan Y, Yang S, Tian Y, Zhang W, Zhou B, et al. (2009) Analysis of the expression protein profiles of lung squamous carcinoma cell using shot-gun proteomics strategy. *Med Oncol* 26: 215-221.
16. Inokuchi J, Lau A, Tyson DR, Ornstein DK (2009) Loss of annexin A1 disrupts normal prostate glandular structure by inducing autocrine IL-6 signaling. *Carcinogenesis* 30: 1082-1088.
17. Nomura H, Uzawa K, Yamano Y, Fushimi K, Nakashima D, et al. (2009) Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with epithelial differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 943-949.
18. Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, et al. (2008) Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 25: 695-702.
19. de Graauw M, van Miltenburg MH, Schmidt MK, Pont C, Lalai R, et al. (2011) Annexin A1 regulates TGF-beta signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6340-6345.



20. Maschler S, Gebeshuber CA, Wiedemann EM, Alacakaptan M, Schreiber M, et al. (2010) Annexin A1 attenuates EMT and metastatic potential in breast cancer. *EMBO Mol Med* 2: 401-414.
21. Wang LP, Bi J, Yao C, Xu XD, Li XX, et al. (2010) Annexin A1 expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Neoplasma* 57: 253-259.
22. Cao Y, Li Y, Edelweiss M, Arun B, Rosen D, et al. (2008) Loss of annexin A1 expression in breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16: 530-534.
23. Perretti M, D'Acquisto F (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 9: 62-70.
24. Babbin BA, Lee WY, Parkos CA, Winfree LM, Akyildiz A, et al. (2006) Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. *J Biol Chem* 281: 19588-19599.
25. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M (2005) An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1: 39-47.
26. Le Y, Murphy PM, Wang JM (2002) Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol* 23: 541-548.
27. Bena S, Brancaleone V, Wang JM, Perretti M, Flower RJ (2012) Annexin A1 interaction with the FPR2/ALX receptor: identification of distinct domains and downstream associated signaling. *J Biol Chem* 287: 24690-24697.
28. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, et al. (2009) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev* 61: 119-161.
29. Zhou Y, Bian X, Le Y, Gong W, Hu J, et al. (2005) Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas. *J Natl Cancer Inst* 97: 823-835.
30. Huang J, Chen K, Gong W, Zhou Y, Le Y, et al. (2008) Receptor "hijacking" by malignant glioma cells: a tactic for tumor progression. *Cancer Lett* 267: 254-261.
31. Chakravarti N, Peddareddigari VG, Warneke CL, Johnson MM, Overwijk WW, et al. (2013) Differential expression of the G-protein-coupled formyl Peptide receptor in melanoma associates with aggressive phenotype. *Am J Dermatopathol* 35: 184-190.
32. Bonnet M, Mishellany F, Papon J, Cayre A, Penault-Llorca F, et al. (2010) Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: e1-11.
33. Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer C, Murray GI (2008) Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer* 98: 426-433.
34. Bai XF, Ni XG, Zhao P, Liu SM, Wang HX, et al. (2004) Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 10: 1466-1470.
35. Malech HL, Gardner JP, Heiman DF, Rosenzweig SA (1985) Asparagine-linked oligosaccharides on formyl peptide chemotactic receptors of human phagocytic cells. *J Biol Chem* 260: 2509-2514.
36. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, et al. (2004) Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23: 3550-3560.
37. Werle M, Schmal U, Hanna K, Kreuzer J (2002) MCP-1 induces activation of MAP-kinases ERK, JNK and p38 MAPK in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 56: 284-292.
38. Wang L, Ling Y, Chen Y, Li CL, Feng F, et al. (2010) Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 297: 42-48.
39. Pupjalis D, Goetsch J, Kottas DJ, Gerke V, Rescher U (2011) Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling. *EMBO Mol Med* 3: 102-114.
40. Kim SD, Kim JM, Jo SH, Lee HY, Lee SY, et al. (2009) Functional expression of formyl peptide receptor family in human NK cells. *J Immunol* 183: 5511-5517.
41. Hoek KS, Goding CR (2010) Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 746-759.





42. Cheli Y, Giuliano S, Botton T, Rocchi S, Hofman V, et al. (2011) Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30: 2307-2318.
43. Yi M, Schnitzer JE (2009) Impaired tumor growth, metastasis, angiogenesis and wound healing in annexin A1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17886-17891.
44. Sawmynaden P, Perretti M (2006) Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 1351-1355.
45. Hashimoto A, Murakami Y, Kitasato H, Hayashi I, Endo H (2007) Glucocorticoids co-interact with lipoxin A4 via lipoxin A4 receptor (ALX) up-regulation. *Biomed Pharmacother* 61: 81-85.
46. Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, et al. (2012) The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics* 11: M111 014647.
47. Lopez-Bergami P (2011) The role of mitogen- and stress-activated protein kinase pathways in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 902-921.
48. Yan Q, Bach DQ, Gatla N, Sun P, Liu JW, et al. (2013) Deacetylated GM3 Promotes uPAR-Associated Membrane Molecular Complex to Activate p38 MAPK in Metastatic Melanoma. *Mol Cancer Res* 11: 665-675.
49. Darnell JE, Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635.
50. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82: 241-250.
51. Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C (2012) Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol* 132: 1877-1885.
52. Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, et al. (2004) Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 64: 8924-8931.
53. Gorzelanny C, Poppelmann B, Strozyk E, Moerschbacher BM, Schneider SW (2007) Specific interaction between chitosan and matrix metalloprotease 2 decreases the invasive activity of human melanoma cells. *Biomacromolecules* 8: 3035-3040.
54. Vaisanen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T (1998) Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 186: 51-58.
55. Gould Rothberg BE, Bracken MB, Rimm DL (2009) Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 101: 452-474.
56. Redondo P, Lloret P, Idoate M, Inoges S (2005) Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. *Clin Exp Dermatol* 30: 541-545.



### **Résultats et discussion**

Lors de cette étude nous avons montré *in vivo* que des injections intra-tumorales d'ARN interférents induisant une diminution du taux stationnaire de la protéine, sont associées de façon significative à une réduction des métastases pulmonaires dans le système B16Bl6. Nous avons également trouvé dans une étude rétrospective sur deux centres (Clermont-Ferrand, Saint-Etienne) une corrélation inverse entre le taux d'ANXA1 dans les tumeurs primitives de 61 patients et le délai d'apparition des métastases HR (3.15 [1.03-9.69]).

Nous avons aussi montré *in vitro*, dans des lignées de mélanome humain, l'existence d'une corrélation entre le statut en ANXA1 et le pouvoir invasif ( $R^2 = 0,041$ ). Nous avons également montré, par qRT-PCR et par Western blot, que différentes lignées de mélanome (M4Beu, SK-MEL3, WM1552c, M3Dau et A375) expriment les FPRs, un récepteur pour ANXA1. De plus pour 3 de ces lignées (M3Dau, A375 et WM1552c), ces récepteurs semblent actifs car le peptide N-terminal synthétique ANXA1<sub>2-26</sub> augmente l'invasion en Matrigel de ces lignées. Par ailleurs, le fMLP (peptide agoniste des FPRs) induit une augmentation du taux de cellules invasives semblable à celle observée avec le peptide ANXA1<sub>2-26</sub> alors qu'en présence de tBoc (antagoniste des FPRs) l'effet d'ANXA1<sub>2-26</sub> sur l'invasion est atténué.

Afin d'étudier les voies de signalisation mobilisées par ANXA1<sub>2-26</sub>, nous avons montré par Western blot et par zymographie que l'interaction d'ANXA1<sub>2-26</sub> avec les FPRs provoque l'activation des voies des MAP Kinases (phosphorylation de p38 et ERK) et de la voie STAT3 (phosphorylation sur la tyrosine 705). Ces phosphorylations sont associées à l'augmentation des activités MMP2, protéases matricielles impliquées dans les processus d'invasion, car l'inhibition de ces voies de signalisation par des inhibiteurs spécifiques altère significativement l'induction de la MMP2 par ANXA1<sub>2-26</sub>.

### **III- Conclusions**

Nos résultats suggèrent qu'ANXA1 pourrait constituer un facteur pronostique du mélanome cutané et une nouvelle cible thérapeutique. Lors de ce travail nous nous sommes focalisés sur les voies de signalisation engagées suite à la fixation du peptide ANXA1<sub>2-26</sub> exogène sur les FPRs. Cependant, le mécanisme d'activation de ces récepteurs par ANXA1 endogène n'est pas parfaitement établi. Le domaine N-terminal d'ANXA1 ne peut être exposé, et donc disponible pour interagir avec les FPRs, que lorsque la protéine est associée à la membrane.



Deux hypothèses ont donc été émises quant à la possibilité d'interaction entre ANXA1 et son récepteur (FPR).

(1) l'interaction entre ANXA1 à la surface externe des cellules et les FPRs exprimés par les cellules cibles se fait de façon juxtacrine.

(2) le clivage d'ANXA1 au niveau de son domaine N-terminal permettrait de libérer un peptide pro-invasif lui donnant ainsi la possibilité d'agir de façon autocrine et paracrine.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons essayé par des approches de protéomique et biochimique, de vérifier et de caractériser le clivage d'ANXA1 dans des modèles de mélanome humain.



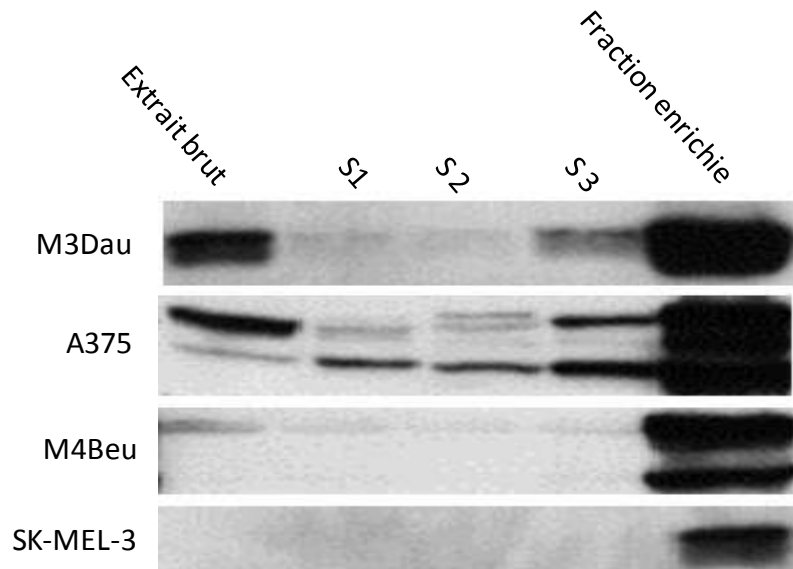
## **Partie II : Expression des annexines et caractérisation du clivage de l'annexine A1 dans le mélanome**

### **I- Introduction**

Nous avons établi l'implication d'ANXA1 dans l'acquisition du phénotype invasif par les cellules de mélanome. La stimulation de l'invasion des cellules de mélanome humain par ANXA1 se fait par une cascade de signalisation impliquant la voie MAPK et la voie STAT3 qui permettent l'activation des MMP2. Dans la partie I, nous avons montré, en utilisant un peptide synthétique (ANXA1<sub>2-26</sub>) mimant ANXA1, que cette cascade de signalisation commence par la fixation d'ANXA1 sur les FPRs membranaires. Cependant, la localisation à la surface des cellules et/ou le clivage d'ANXA1 n'ont pas été mis en évidence. Cette localisation et/ou clivage semblent être cruciaux pour l'interaction de la protéine avec son récepteur, car ce sont les configurations les plus probables où le domaine N-terminal de la protéine est disponible pour interagir avec les FPRs.

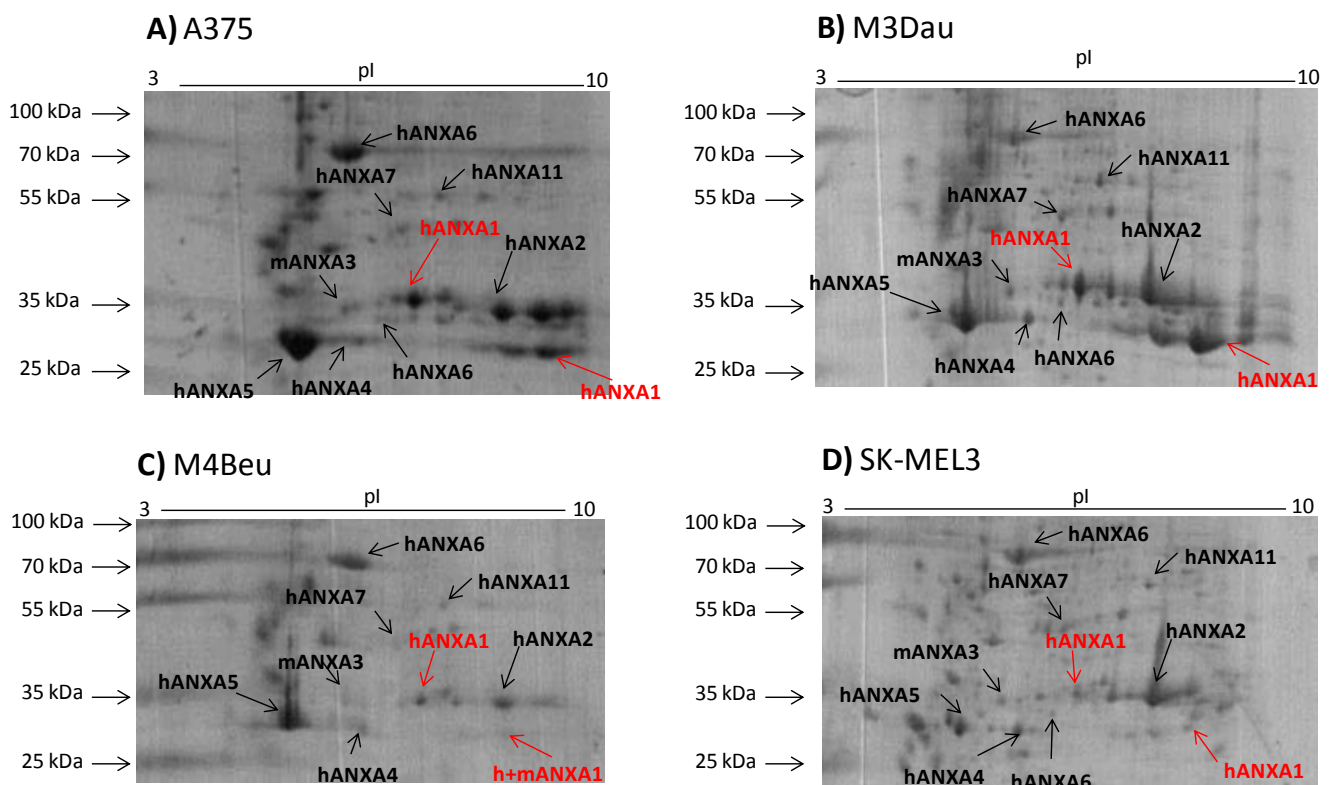
Dans un premier temps nous avons recherché par des techniques classiques d'immunoblots et des approches de spectrométrie de masse la présence du peptide ANXA1<sub>2-26</sub> dans les extraits protéiques de cultures cellulaires (cellules et surnageants), d'extraits tumoraux de mélanomes et de sérums de patients. Ces études n'ont pas permis de mettre en évidence ce peptide. Nous avons également recherché d'autres peptides correspondants aux clivages par différentes protéases (**cf tableau 3, Partie Bibliographie**). Cette approche n'a pas non plus donné de résultats (résultats non présentés). Notre stratégie a alors consisté à analyser l'extrémité N-terminale d'ANXA1 clivée utilisant le séquençage d'Edman sur des protéines isolées. Pour cela, nous avons mis au point une approche protéomique pour enrichir des extraits de tumeur en annexines et notamment en ANXA1 pleine longueur et clivée. Cette technique a permis d'une part de déterminer le site de clivage d'ANXA1 dans les lignées de mélanome humain, et d'autre part, d'établir le profil d'expression des annexines sur les tumeurs correspondantes. Nous avons également montré, par des approches biochimiques, qu'ANXA1 peut être localisée à la surface cellulaire, mais aussi qu'elle peut subir un clivage dans sa partie N-terminale par une sérine protéase membranaire.





**Figure 1: Evaluation de l'enrichissement en ANXA1 par précipitation au calcium**

Un enrichissement en annexines a été réalisé à partir d'extraits de xénogreffes humaines d'A375, M3Dau, M4Beu et SK-MEL-3. La présence d'ANXA1 a été testée par Western blot dans les différentes fractions éliminées (10µg/fraction) lors de cet enrichissement ainsi que dans 10 µg de précipité de calcium (fraction enrichie).



**Figure 2: Profilage des annexines par précipitation au calcium.**

Des fractions enrichies (75 µg) en annexines ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle (gamme de pH 3-10). Les gels A (A375), B (M3Dau), C (M4Beu) et D (SK-MEL3) montrent les annexines identifiées par MALDI-TOF MS pour chaque tumeur. m= murin, h= humain.

## II- Résultats et discussion

### 1) Enrichissement en annexines de xénogreffes de mélanome humain

Des xénogreffes de mélanome humain (A375, M3Dau, SK-MEL-3 et M4Beu) implantées chez des souris « nudes » ont été utilisées pour cette étude. Les lignées correspondantes présentent, *in vitro*, des pouvoirs invasifs variables, les lignées A375 et M3Dau sont significativement plus invasives que les lignées SK-MEL-3 et M4Beu (partie I). Afin d'enrichir les extraits tumoraux en annexines, nous avons utilisé la propriété commune à toutes les annexines, de se fixer sur les membranes phospholipidiques de façon calcium dépendante. Pour évaluer cette procédure, ANXA1 a été utilisée comme témoin de présence des annexines. Le Western blot de la **figure 1** montre l'efficacité d'enrichissement en ANXA1 dans les 4 tumeurs testées ainsi que les faibles pertes observées lors des différentes étapes du protocole.

Pour chaque tumeur, la fraction enrichie en annexines a été analysée par électrophorèse bidimensionnelle. Après coloration au bleu de coomassie, des spots dont la migration (PM et pI) correspond aux caractéristiques des annexines ont été prélevés. Les protéines de chaque spot ont été identifiées en réalisant leur carte peptidique par MALDI-TOF MS (voir annexes 1 à 5). Les annexines identifiées sont repérées sur le gel correspondant (**Figure 2**) et regroupées dans le **tableau 1**. Pour chaque tumeur, 8 des 12 annexines ont été effectivement identifiées. Les poids moléculaires et les points isoélectriques expérimentaux des annexines identifiées sont en concordance avec les données théoriques sauf pour des formes tronquées d'ANXA1 et A6, ayant respectivement des poids moléculaires de 33 et 35 kDa (**Figure 2 et Tableau 1**). Les ANXA1, A2, A5 et A6 ont des statuts différents selon les lignées de mélanome étudiées. Seule l'expression des ANXA1 et A2 montre *in vitro* une association avec le pouvoir invasif des différentes lignées testées (**Tableau 1**). Ces données renforcent le rôle d'ANXA1 dans les processus d'invasion et de métastase mis en évidence dans la partie I. ANXA2 a été très peu étudiée dans le mélanome. Cependant, des études ont montré son implication dans l'angiogenèse, la migration et l'invasion dans les cancers ovariens (303) et l'implication de sa forme sécrétée dans la progression du cancer du sein (304).

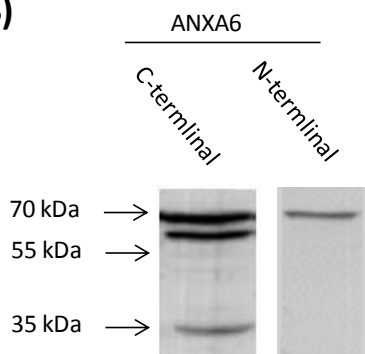
ANXA6 a été largement étudiée dans les cancers. Par exemple, la réduction de son expression a été associée à la propagation du cancer du sein, et la diminution de l'expression d'ANXA6 est à l'origine de la perte des contacts cellule-cellule et/ou cellule-MEC (305). Par contre, la

Protéine identifiée	Numéro d'accèsion	PM (kDa)/pI		Nombre de peptides	% de couverture	Spots représentatifs/lignée (pouvoir <i>invasif in vitro</i> )			
		théorique	apparent			M4Beu (+)	SK-MEL3 (+)	A375 (+++++)	M3Dau (+++++)
ANXA1 (entière)	P04083	38,7/6,6	37/6,9	17	55				
ANXA1 (tronquée)	P04083	38,7/6,6	33,7/8,8	11	39				
ANXA2	P07355	38,6/7,6	36/7,7	20	48				
ANXA3	O35639	36,3/5,5	36/5,7	16	54				
ANXA4	P09525	35,8/5,8	34/6,2	18	42				
ANXA5	P08758	35,9/4,9	34/4,8	13	49				
ANXA6 (entière)	P08133	75,4/5,4	70/5,5	21	33				
ANXA6 (tronquée)	P08133	75,4/5,4	35/6,3	17	27	N.I			
ANXA7	P20073	52,7/5,5	50/6,4	13	28				
ANXA11	P50995	54,3/7,5	57/7,3	12	24				

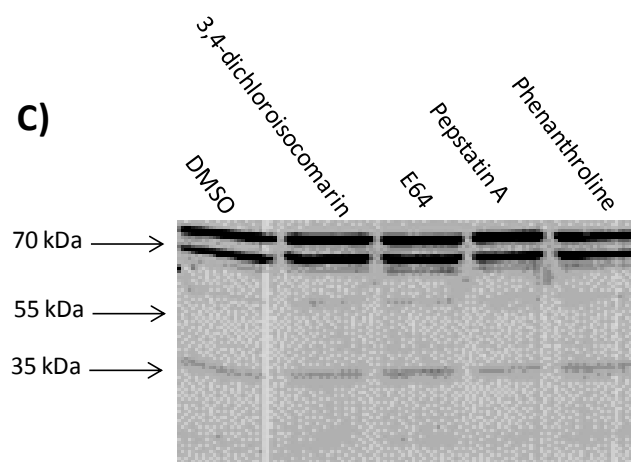
**Tableau 1: Les différentes annexines identifiées par MALDI-TOF MS**

**A)**

**B)**



**C)**



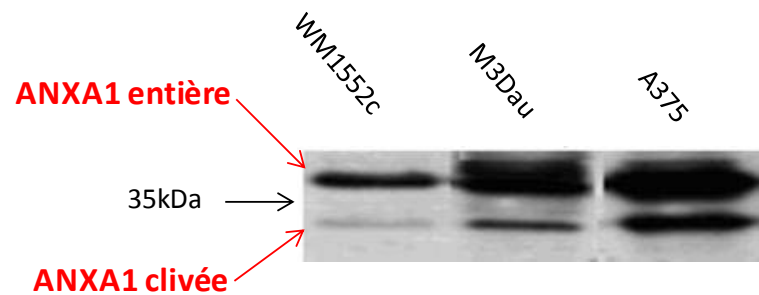
**Figure 3: Mise en évidence de l'ANXA6 tronquée**

(A) Peptides d'ANXA6 détectés par MALDI-TOF MS après digestion tryptique, permettant de caractériser la protéine tronquée. (B) Extraits cellulaires d'A375 révélés par des anticorps reconnaissant la partie C-terminale (gauche) ou N-terminale (droite) d'ANXA6. (C) Des cellules A 375 ont été incubées pendant 18 heures en présence d'inhibiteurs de protéases (3,4 dichloroisocoumarin 50  $\mu$ M, E64 20  $\mu$ M, pepstatine A 2 mM, 1,10 phénanthroline 75  $\mu$ M). L'expression d'ANXA6 a été ensuite analysée dans chaque échantillon par Western Blot.

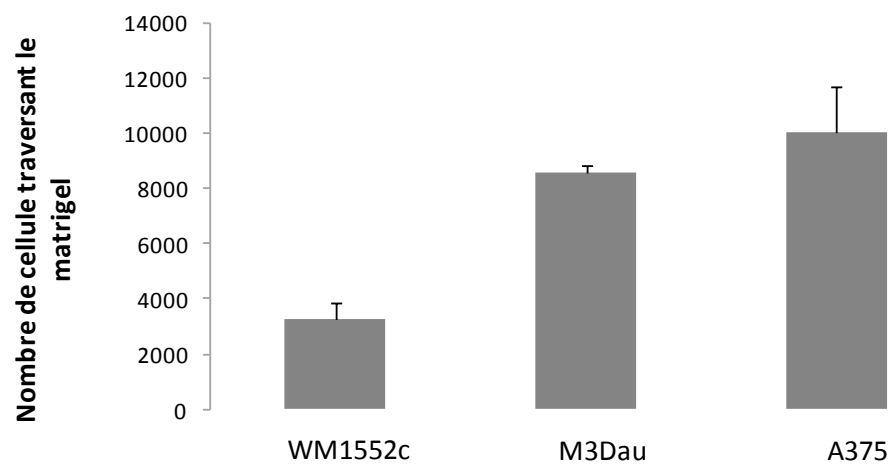
forme tronquée de cette protéine n'a jamais été observée. L'analyse des peptides d'ANXA6 tronquée générés par traitement des spots correspondant par la trypsine, a montré un recouvrement de la moitié C-terminale de la protéine (**Figure 3A**) dans les tumeurs SK-MEL3, M3Dau et A375. Nous avons confirmé la présence d'ANXA6 tronquée dans la lignée cellulaire A375. L'immuno-blot avec un anticorps spécifique à la partie C-terminale de la protéine (**Figure 3B**) a montré la présence de 3 bandes immuno-réactives. Ces trois dernières sont approximativement à 70, 68 et à 35 kDa. L'isoforme de l'ANXA6 à 68 kDa a été déjà observée et il a été démontré que cette annexine provient d'un épissage alternatif de l'ARNm (306). Cependant, l'ANXA6 tronquée avec un poids moléculaire apparent de 35 kDa n'a pas été observée jusqu'à présent. De plus, l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la partie N-terminale de la protéine ne montre aucune bande immuno-réactive à 35 kDa (**Figure 3B**). Ce résultat confirme ce qui a été observé dans les tumeurs quant à la présence d'une forme tronquée d'ANXA6. Afin de vérifier que l'ANXA6 tronquée n'est pas issue d'un clivage de la protéine pleine longueur, des cellules A375 ont été maintenues en culture en présence de différents inhibiteurs de protéases, le 3,4 dichloroisocoumarin, l'E64, la pepstatine A et la 1,10 phénanthroline. Les protéines ont ensuite été analysées par Western Blot avec un anticorps reconnaissant la partie C-terminale de l'ANXA6. Aucun inhibiteur n'a d'effet sur la présence d'ANXA6 tronquée dont la quantité reste constante (**Figure 3C**). Ces résultats permettent de poser l'hypothèse qu'un épissage alternatif de l'ARNm de la protéine est à l'origine de cette forme d'ANXA6.

La forme tronquée d'ANXA1 a déjà été observée dans des conditions physiologiques et en particulier dans différentes lignées cellulaires du système immunitaire (voir tableau 3, bibliographie) et également dans le cancer colorectal (307). Nous avons montré l'existence de la protéine à 33KdA dans les lignées B16 (194), ici nous montrons que cette forme clivée est retrouvée dans les mélanomes humains en culture et xénogreffes. Si des protéases clivant ANXA1 ont pu être identifiées dans certaines conditions physiologiques et pathologiques, aucun élément n'est disponible pour le clivage d'ANXA1 dans le mélanome. Pour la suite de l'étude nous nous sommes focalisés sur la caractérisation du clivage d'ANXA1.

**A)**



**B)**



**Figure 4: ANXA1 clivée est plus présente dans les lignées de mélanome les plus invasives**

A) Immuno-blot avec un anticorps reconnaissant la partie C-terminale d'ANXA1 sur des extraits cellulaire A375, M3Dau et WM1552c. B) Histogramme montrant le nombre de cellules invasives ayant traversé le matrigel.

## 2) Caractérisation du clivage d'ANXA1

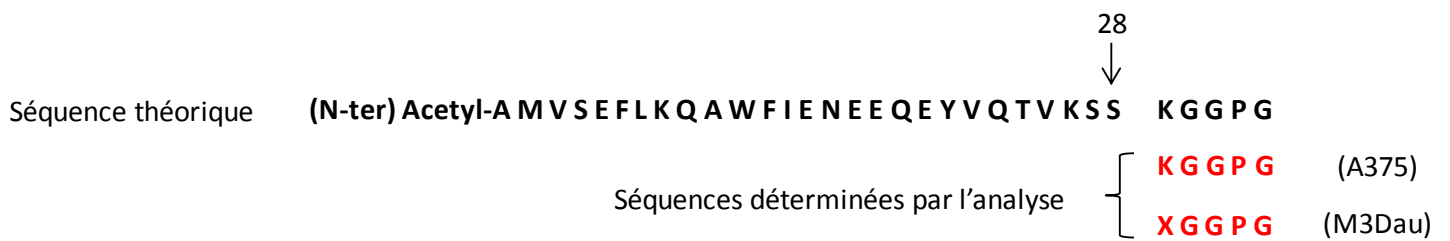
### a) Association entre ANXA1 clivée et invasion

Pour confirmer la présence d'ANXA1 clivée dans des lignées cellulaires de mélanome, un Western blot a été réalisé sur des extraits protéiques de cellules A375, M3Dau et WM1552c (**Figure 4A**). Les trois lignées montrent la présence de deux bandes immuno-réactives à environ 37 et à 33 kDa et qui correspondent respectivement à ANXA1 entière et clivée. Etant donné que l'anticorps utilisé reconnaît la partie C-terminale de la protéine et que l'utilisation d'un anticorps spécifique à la partie N-terminale ne révèle qu'une seule bande (voir partie 1), on peut conclure qu'ANXA1 est clivée dans sa partie N-terminale. Compte tenu de la très faible quantité d'ANXA1 clivée dans les fractions enrichies obtenues à partir des tumeurs M4Beu et SK-MEL-3 (**Figure 2 et Tableau 1**), le Western blot sur les extraits protéiques de ces lignées cellulaires n'a montré que la présence d'ANXA1 entière (résultat non présenté). Par ailleurs, le niveau d'expression d'ANXA1 clivée tout comme celui de la forme entière est associée *in vitro* au pouvoir invasif de ces trois lignées (**Figure 4B**). Compte tenu de ce résultat et du fait que le domaine N-terminal d'ANXA1 ne peut être exposé que lorsque la protéine est associée à la membrane (246), une hypothèse a été émise : l'interaction entre ANXA1 à la surface externe des cellules et les FPRs des cellules voisines se fait de façon juxtacrine. Le clivage d'ANXA1 dans son domaine N-terminal pourrait libérer un peptide pro-invasif lui permettant également d'agir de façon autocrine et paracrine.

### b) Détermination du site de clivage d'ANXA1

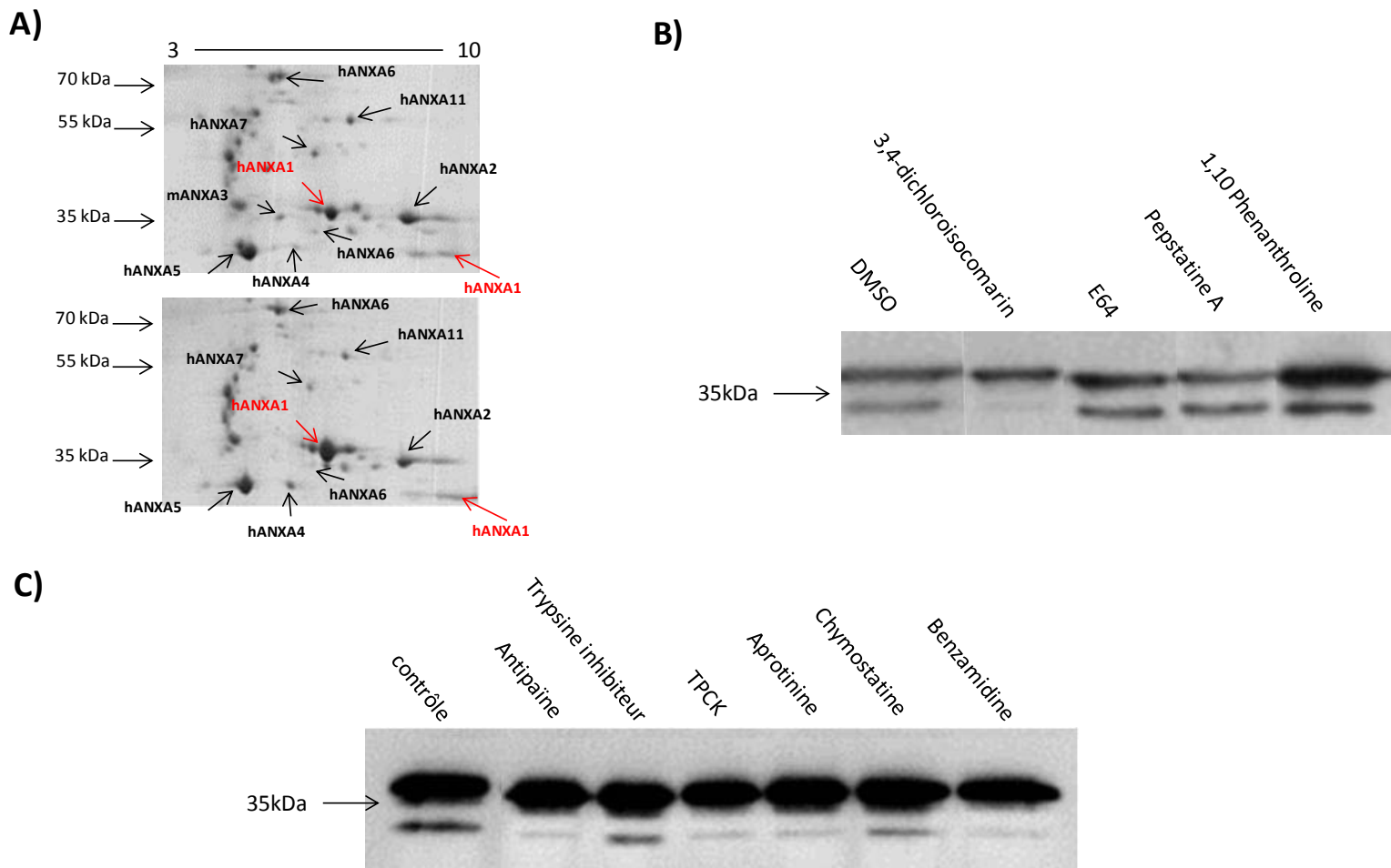
Selon la lignée cellulaire et selon la protéase mise en jeu, ANXA1 peut être clivée à différentes positions dans sa partie N-terminale (**cf tableau 3, Partie Bibliographie**). Par exemple, elle peut être clivée après la phénylalanine 7 par ADAM-10, après le tryptophane 12 par la cathepsine D, après l'alanine 11, les valines 22 et 36 par la PR3, après la lysine 26 par la calpaïne et après la lysine 29 par la plasmine. Du fait des différents sites de clivage qu'ANXA1 peut avoir, la masse du peptide libéré serait variable.

Afin de déterminer le site de clivage d'ANXA1 dans le mélanome et de déterminer la masse théorique du peptide ANXA1 libéré, un séquençage N-terminal par dégradation d'Edman a été réalisé sur ANXA1 clivée provenant des tumeurs A375 et M3Dau. L'analyse a révélé les séquences K<sup>29</sup>GGPG et X<sup>29</sup>GGPG pour les tumeurs A375 et M3Dau respectivement



### Figure 5 : Le clivage d'ANXA1 se produit après la serine 28

Des fractions enrichies de tumeurs A375 et M3Dau ont été séparées par électrophorèse bidimensionnelle puis transférées sur des membranes PVDF. Les spots correspondant à ANXA1 clivée ont été prélevés et un séquençage N-terminal par dégradation d'Edman a été réalisé.



### Figure 6 : ANXA1 est clivée par une protéase à sérine dans la lignée A375

- (A) Un enrichissement en annexines a été réalisé à partir d'extraits protéiques de xénogreffes et de cellules A375. 50 µg de chaque préparation ont été séparés par électrophorèse bidimensionnelle (gamme de pH 3-10). Les annexines identifiées par MALDI-TOF MS sont présentées sur les gels. m= murine, h= humaine.
- (B) Expression d'ANXA1 testée par Western Blot dans des cellules A 375 après incubation pendant 18 heures en présence de 3,4 dichloroisocoumarin (50 µM), E64 (20 µM), pepstatine A (2 mM), 1,10 phénanthroline (75 µM);
- (C) Expression d'ANXA1 testée par Western Blot dans des cellules A 375 après incubation en présence d'antipain (250 µM), trypsine inhibiteur (100µM), TPCK (250 µM), aprotinine (30 µM), chymostatine (250 µM) ou benzamidine (600 µM).

(Figure 5). Ces résultats démontrent que le clivage se produit après la sérine 28, un site différent de ceux décrits jusqu'à présent.

c) Détermination de la classe de protéases responsable du clivage d'ANXA1

La caractérisation du clivage d'ANXA1 a été effectuée sur la lignée cellulaire A375, car c'est la lignée qui présente le plus de clivage d'ANXA1. Le profil des annexines dans les fractions enrichies des cellules A375 est semblable à celui des tumeurs correspondantes (figure 6A). En particulier ANXA1 clivée migre au même poids moléculaire apparent (33 kDa) et au même point isoélectrique (8,8) dans les deux échantillons, ce qui suggère que le clivage dans les tumeurs et dans les cellules est réalisé par la même protéase.

Dans le but de déterminer la classe de protéases responsable du clivage d'ANXA1, des cellules A375 ont été maintenues en culture en présence de différents inhibiteurs de protéases. Après traitement par 3,4 dichloroisocoumarin, E64, pepstatine A et 1,10 phénanthroline (voir tableau 1 de la partie **Matériels et méthodes**) une analyse du clivage d'ANXA1 a été effectuée par Western Blot sur les extraits protéiques. Par comparaison avec le contrôle, seule la condition 3,4 dichloroisocoumarin montre une diminution évidente du signal correspondant à la forme clivée de la protéine (Figure 6B). Ce résultat permet de conclure qu'une protéase à sérine est responsable du clivage d'ANXA1.

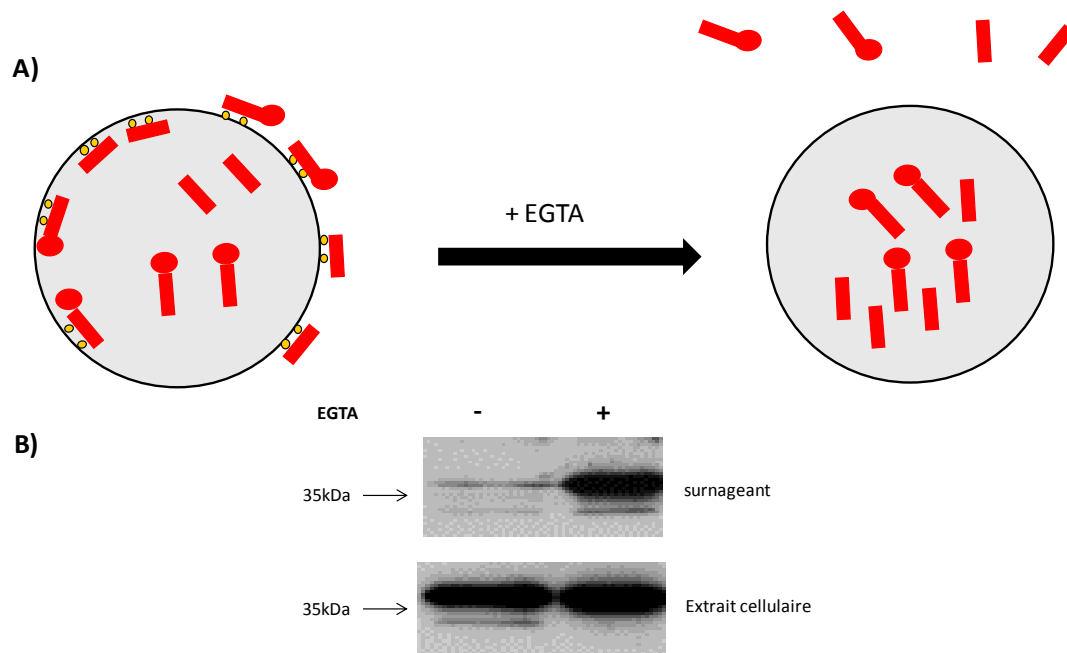
Une série d'inhibiteurs de protéases à sérine, dont le spectre d'inhibition est plus limité que celui du 3,4 dichloroisocoumarin, a été testée. TPCK, benzamidine, chymostatine, antipaïne et aprotinine ont été testées. L'expérience s'est déroulée dans les mêmes conditions que précédemment et le clivage d'ANXA1 a été analysé par Western Blot.

Comme le montre la figure 6C, pour les conditions TPCK, trypsine inhibiteur, antipaïne, benzamidine et aprotinine, le signal correspondant à ANXA1 clivée est considérablement diminué alors qu'aucun effet n'est observé pour les conditions chymostatine et trypsine inhibiteur. Cela confirme qu'une sérine protéase est à l'origine du clivage d'ANXA1

d) Localisation subcellulaire du clivage d'ANXA1

Afin de vérifier la localisation d'ANXA1 sur la membrane plasmique, nous avons utilisé la propriété de cette protéine à se lier aux membranes phospholipidiques de façon calcium dépendante. Pour cela, les cellules A375 ont été incubées dans un milieu de culture contenant

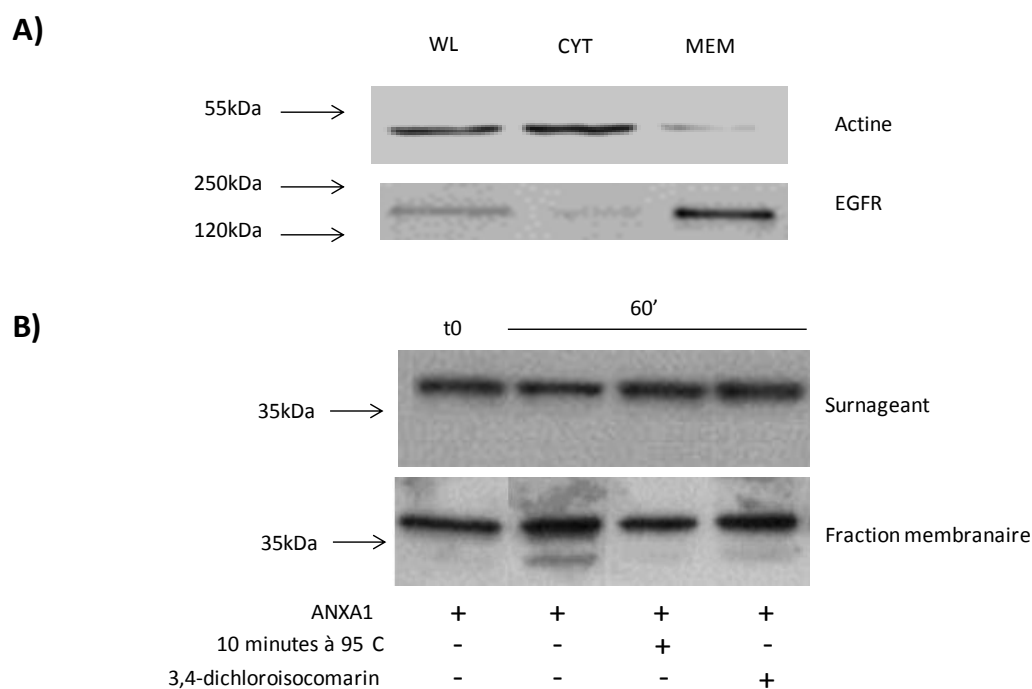




**Figure 7 : ANXA1 clivée se trouve exclusivement à la surface cellulaire**

(A) Procédure expérimentale pour l'étude de l'ANXA1 associée à la surface cellulaire.

(B) Les cellules A375 ont été incubées pendant une heure avec un milieu de culture contenant ou non de l'EGTA (2mM). La présence d'ANXA1 a été ensuite étudiée dans le lysat cellulaire et dans le surnageant par Western Blot.



**Figure 8 : La sérine protéase responsable du clivage d'ANXA1 est localisée au niveau membranaire**

(A) Les fractions membranaire et cytoplasmique ont été préparées comme décrit dans matériel et méthodes. Ce fractionnement a été évalué en analysant la présence d'EGFR et d'Actine par Western Blot. WL = extrait brut, CYT = fraction cytoplasmique, MEM = fraction membranaire.

(B) L'ANXA1 recombinante (portant un tag histidine) a été incubée 60 minutes avec la fraction membranaire ou le surnageant en absence ou en présence de 3,4 dichloroisocumarine, ou avec une fraction dénaturée par chauffage à 95°C. La protéine recombinante a été récupérée ensuite à l'aide de billes magnétiques et le clivage a été évalué par Western Blot.

de l'EGTA (chélateur de calcium). La présence d'ANXA1 a été étudiée dans l'extrait cellulaire et dans le surnageant correspondant par Western Blot.

La présence d'EGTA permet de chélater le calcium, de dissocier ANXA1 et de la libérer dans le surnageant (**Figure 7A**). Le surnageant contenant l'EGTA montre effectivement plus d'ANXA1 que le surnageant témoin (**Figure 7B : blot du haut**), ce qui démontre la présence d'ANXA1 entière et clivée à la surface cellulaire. De plus, la distribution d'ANXA1 clivée est modifiée en fonction de la présence d'EGTA et elle est retrouvée uniquement au niveau du surnageant (**Figure 7B**). Ce résultat montre qu'ANXA1 clivée se trouve exclusivement à la surface des cellules et démontre que le clivage se produit après la localisation de la protéine à la surface cellulaire.

Il est donc possible d'émettre deux hypothèses quant à la localisation de la protéase recherchée. Pour pouvoir interagir avec ANXA1, la protéase est

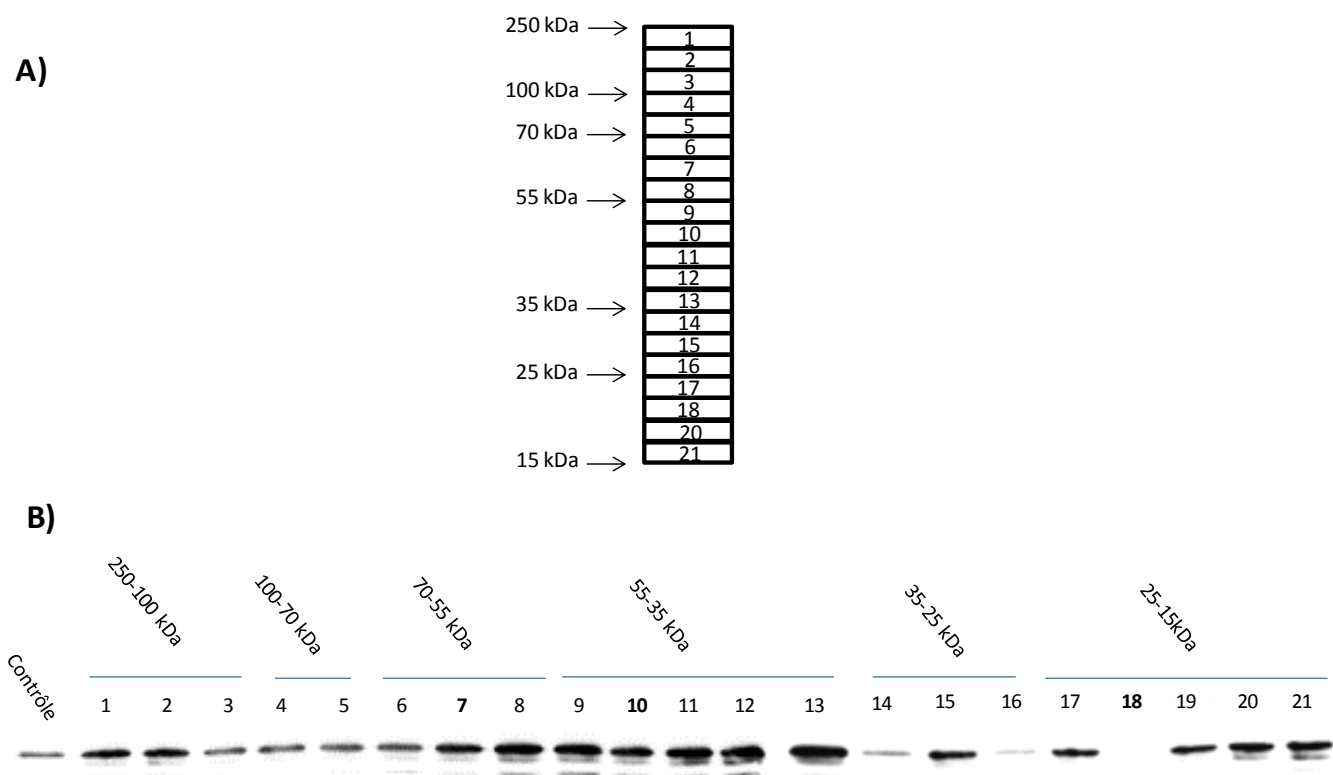
- soit co-localisée avec ANXA1 au niveau membranaire
- soit sécrétée pour avoir accès à la surface cellulaire

e) Localisation de la protéase responsable du clivage d'ANXA1

Sur des culots cellulaires A375, un fractionnement sub-cellulaire a été réalisé afin de séparer les protéines membranaires des protéines cytoplasmiques. Ce fractionnement a été évalué en analysant par Western Blot la présence d'EGFR et d'actine qui sont respectivement des marqueurs membranaires et cytoplasmiques, protéines que l'on retrouve effectivement dans les fractions correspondantes (**Figure 8A**).

Nous avons ensuite examiné la contribution des serine protéases membranaires et extracellulaires dans le clivage d'ANXA1. Pour cela, ANXA1 recombinante, portant un tag histidine, a été incubée avec la fraction membranaire ou avec le milieu conditionné résultant de la culture des cellules A375 en présence ou en absence de 3,4 dichloroisocomarin. La protéine recombinante a ensuite été purifiée à l'aide de billes magnétiques grâce à son tag histidine et le clivage a été évalué par Western Blot.

La **figure 8B** montre qu'en présence de la fraction membranaire, ANXA1 est clivée. Par contre, en présence d'une fraction dénaturée (95°C pendant 10 minutes) ou pré-incubée avec le 3,4 dichloroisocomarin, aucun effet n'a été observé. Ceci confirme que le clivage observé



**Figure 9 : Fractionnement des protéases membranaires des cellules A375 clivant ANXA1**

La fraction membranaire des cellules A375 (30µg) a été séparée par SDS/PAGE dans des conditions non dénaturantes. Le gel a ensuite été lavé par une solution de triton X-100 (1%) pour renaturer les protéines, puis il a été coupé en 21 fractions (A).

Chaque fraction a été incubée avec 50 ng d'ANXA1 recombinante pendant 24 heures à 4°C puis 24 heures à 37°C. Le clivage d'ANXA1 a été ensuite analysé dans chaque échantillon par Western blot (B).

Protéase	Nature	Fraction
sous unité $\alpha$ de la peptidase de maturation mitochondriale	métalloprotéase	8, 10, 11, 12
aminopeptidase cytoplasmique	métalloprotéase	8, 10
sous unité 2 du cytochrome bc1	métalloprotéase	8, 11, 12
dihydrolipoamide déshydrogénase mitochondriale	serine protéase	9, 10, 11
nicaline	non homologuée	9, 10, 11
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	sérine protéase	10
CAAX prenyl protease 1	métalloprotéase	12
sous unité $\beta$ de la peptidase de maturation mitochondriale	métalloprotéase	12
trypsine 3	sérine protéase	12

**Tableau 2: protéases identifiées dans les fractions d'intérêt**

Cinquante µg de protéines membranaires de la lignée A375 ont été séparées par SDS/PAGE. Les bandes d'intérêt (correspondantes aux fractions 8, 9, 10, 11 et 12) ont été excisées et traitées avec la trypsine pour l'identification des protéines par LC-MS/MS. L'analyse des protéines identifiées et la sélection des protéases a été effectuée par la base de donnée MSDA.

est dû à une sérine protéase. Par ailleurs, aucun effet n'a été observé sur le clivage d'ANXA1 en présence du milieu conditionné résultant de la culture des cellules A375 (**Figure 8B**). Ces résultats montrent que le clivage d'ANXA1, dans la lignée A375, se produit sous l'action d'une sérine protéase membranaire.

f) Identification de la protéase responsable du clivage d'ANXA1

Deux échantillons protéiques de la fraction membranaire des cellules A375 ont été séparés en parallèle par SDS/PAGE dans des conditions natives. Après électrophorèse, les protéines ont été renaturées et le gel a été divisé horizontalement en 21 fractions (**Figure 9A**). Pour le premier échantillon, chaque fraction a été incubée avec ANXA1 recombinante. Le clivage a été ensuite évalué par Western blot. Les fractions 8, 9, 10, 11 et 12 ont la plus forte activité de clivage d'ANXA1 (**Figure 9B**). Les fractions correspondantes du deuxième échantillon ont été analysées en LC-MS/MS afin d'identifier les protéases présentes. Plusieurs protéases ont été mises en évidence, parmi celles-ci la peptidase mitochondriale, la sous unité 2 du cytochrome bc1, la dihydrolipoamide déshydrogénase mitochondriale, la CAAX prenyl protease 1 et l'aminopeptidase cytoplasmique ne semblent pas être responsables du clivage d'ANXA1 du fait de leur localisation subcellulaire (mitochondrie et cytoplasme) et de leur nature (métalloprotéase) (**Tableau2**). Deux sérine protéases ont été identifiées, la trypsine 3 et la Lysosomal Pro-X carboxypeptidase. Cette carboxypeptidase clive les protéines du côté C-terminal d'une proline et la trypsine 3 clive du côté C-terminal d'une lysine/arginine. Leur spécificité n'est donc pas celle observée ici.

Une autre protéase, la nicaline a été mise en évidence (voir annexe 6). Il s'agit d'une protéase membranaire dont la spécificité n'est pas définie (308). Cette protéine est présente dans trois des cinq fractions actives. Toutes ces observations suggèrent que la nicaline serait la protéase recherchée.

### III-Conclusions

Dans cette partie, nous avons pu mettre au point une approche protéomique permettant d'analyser simultanément, dans des xénogreffes de mélanome humain, l'expression de 8 des 12 annexines. Cette technique a permis d'une part d'identifier une forme tronquée d'ANXA6 qui n'a jamais décrite jusqu'à présent, d'autre part, de séquencer la forme clivée d'ANXA1. Les analyses de séquençage ont révélé un nouveau site de clivage d'ANXA1 situé après la



sérine 28. De plus, les fractionnements subcellulaires d'extraits protéiques et l'utilisation d'inhibiteurs de protéases ont permis de montrer qu'une sérine protéase membranaire est responsable de ce clivage. Enfin, les analyses LC-MS/MS ont mis en évidence, la nicaline, comme un candidat potentiel responsable de la coupure d'ANXA1.

Ces résultats ont permis d'améliorer nos connaissances sur le mode d'action d'ANXA1 dans le mélanome cutané et plus particulièrement son clivage. La confirmation de l'implication de la nicaline dans le clivage d'ANXA1 serait un point clé pour la recherche du (des) peptide(s) natif(s) d'ANXA1. D'autre part, des travaux supplémentaires sont requis pour déterminer l'origine et le rôle d'ANXA6 tronquée, notamment dans la cancérogenèse.



# **DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES**





Le mélanome cutané est un cancer très agressif avec un pronostic très défavorable. Sa dangerosité provient de sa capacité à former des métastases. Une fois sous sa forme métastatique, le taux de survie à 5 ans reste très faible et ne dépasse pas 5% (309, 310). En France, il est parmi les cancers les plus mortels et son incidence élevée en a fait un enjeu de santé publique. Bien que de nouvelles stratégies prometteuses pour le traitement du mélanome aient été développées, à ce jour, les options thérapeutiques sont limitées. Cependant, le diagnostic précoce du mélanome rend possible la gestion de la pathologie. En effet, le mélanome de stade I ou II localisé dans le site primitif de la lésion et n'ayant pas encore métastasé est curable par exérèse chirurgicale. Le mélanome cutané souffre par ailleurs d'un manque de marqueurs pronostiques efficaces qui faciliteraient la prise en charge des patients. L'indice de Breslow correspondant à l'épaisseur de la tumeur primitive, reste pour l'heure, le critère pronostique le plus fiable. Toutefois, 15% des patients avec un faible indice de Breslow ( $< 1\text{mm}$ ) développent des métastases (311). Ce dernier point a motivé différentes études pour identifier de nouveaux marqueurs d'agressivité tumorale qui permettraient d'affiner la valeur pronostique de l'indice de Breslow et d'améliorer ainsi la prise en charge des patients.

L'identification des acteurs moléculaires de l'invasion du mélanome cutané est l'un des axes de recherche de l'équipe. Le mélanome se développe dans l'épiderme pendant la phase RGP puis acquiert des propriétés invasives lui permettant d'envahir le derme pendant la phase VGP. Au niveau du derme, les cellules de mélanome peuvent être en contact avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour disséminer et former des métastases à distance. Ainsi l'invasion du derme est la toute première étape qui mène à la formation de métastases. Cette invasion est due à un ensemble de dérégulations moléculaires qui permettent aux cellules de se détacher de leur environnement primitif, de dégrader les composants de la JDE pour envahir et proliférer au sein du tissu dermique. Dans le laboratoire, deux lignées de mélanome murin dérivant l'une de l'autre mais ayant des capacités invasives différentes, ont été sélectionnées : B16Bl6 est capable de former des métastases pulmonaires spontanément à partir d'une tumeur primitive, alors que B16F10 n'en forme pas. Les profils d'expression protéique des deux lignées sont très proches et toute protéine montrant une expression différente pourrait être potentiellement impliquée dans la transition de la phase RGP vers la phase VGP. Une étude protéomique comparative a été réalisée sur ces deux lignées ainsi que sur les tumeurs correspondantes. Parmi les protéines différentielles identifiées, ANXA1 est surexprimée dans la lignée agressive B16Bl6. De plus, l'inhibition de l'expression d'ANXA1



par siRNA diminue significativement le pouvoir invasif *in vitro* de la lignée B16Bl6 (194). Toutes ces données indiquent qu'ANXA1 pourrait jouer un rôle clé dans les processus de dissémination du mélanome et qu'elle pourrait être un marqueur pronostique de ce dernier. Le but de ce travail était d'une part de valider les données obtenues sur les modèles murins dans les modèles humains et d'autre part d'étudier le rôle et le mécanisme d'action d'ANXA1 dans l'invasion du mélanome cutané humain.

## **I- Rôle d'ANXA1 dans la dissémination du mélanome cutané**

### **1) Etudes in vivo**

Nous avons montré dans deux études *in vivo* qu'il existe une corrélation entre le statut en ANXA1 dans la tumeur primitive et la susceptibilité de développer des métastases. Dans le modèle B16, la diminution de l'expression d'ANXA1 par siRNA dans la tumeur primitive réduit significativement le nombre de métastases. Et par ailleurs, dans une étude clinique rétrospective sur 61 patients, le statut en ANXA1 dans la tumeur primitive est associé au risque de développer des métastases. Ces données suggèrent qu'ANXA1 pourrait être un facteur pronostique du mélanome cutané, cependant une étude sur une large cohorte est requise pour valider sa valeur pronostique. L'absence de corrélation entre l'indice de Breslow et le statut en ANXA1 lors de l'étude clinique montre qu'ANXA1, indépendamment de la prolifération, joue un rôle dans l'invasion tumorale. Cela a été confirmé par l'absence d'effet sur la prolifération tumorale lors de l'inhibition de l'expression d'ANXA1 dans le modèle B16. Yi.M *et al* ont montré que les tumeurs B16 dans des souris KO pour ANXA1 ont une agressivité atténuée mais aussi une croissance et une vascularisation diminuée par rapport aux souris contrôles (312) ce qui suggère qu'ANXA1 localisée dans le stroma jouerait un rôle important dans la progression tumorale. Dans l'étude réalisée au laboratoire sur les tumeurs B16, nous pouvons supposer qu'ANXA1 tumorale/stromale résiduelle, après traitement avec les siRNA, serait suffisante pour maintenir la croissance tumorale tout en diminuant significativement le nombre de métastases. Cependant, lors d'une étude plus récente, une équipe a utilisé un modèle de xénogreffes qui permet donc de différencier les protéines stromales des protéines tumorales. Les auteurs ont comparé les protéines exprimées par les tumeurs A375 et les tumeurs MA-2 ainsi que les stromas associés, les cellules MA-2 dérivant des cellules A375, mais ayant une capacité plus importante à former des métastases. Il en est conclu que seule l'ANXA1 tumorale contribue à l'acquisition du pouvoir invasif par la



tumeur (313). L'ensemble de ces données montrent, selon le modèle, les rôles variés d'ANXA1 sur la prolifération, l'angiogénèse et l'invasion du mélanome.

Dans notre étude rétrospective, l'expression d'ANXA1 est un facteur indépendant de l'indice de Breslow, il est tout à fait intéressant de tester sa valeur pronostique sur des tumeurs de faible épaisseur, tumeurs pour lesquelles l'indice de Breslow est moins performant. Une étude clinique rétrospective incluant 63 patients avec des tumeurs primitives d'épaisseur inférieure à 1 mm est en cours de réalisation.

## 2) Etudes in vitro

Les données obtenues *in vivo* impliquent ANXA1 dans la dissémination du mélanome. Nous avons recherché le(s) mécanisme(s) pouvant être responsable(s) de l'invasion du mélanome. La stimulation de l'invasion en chambre de boyden de 3 lignées de mélanome (A375, M3Dau, WM1552c) par le peptide ANXA1<sub>2-26</sub>, est en faveur de la présence d'un récepteur membranaire médiant le signal ANXA1. Les FPRs ont une affinité pour ANXA1 et pour le peptide N-terminal de la protéine (314). Plusieurs études ont montré que l'augmentation du taux d'ANXA1 lors du processus de cancérogenèse est souvent accompagnée par l'expression des FPRs par les cellules cancéreuses (191, 192, 307). Nous avons montré par qRT-PCR et par Western blot, pour les cinq lignées de mélanome humain testées, la présence des FPRs. De plus, nous avons observé que le statut en FPRs dans ces lignées est plus élevé que dans les mélanocytes. Ce résultat est en accord avec la comparaison de l'expression des FPRs dans des naevi et dans des biopsies de mélanome humain (195).

De la même façon que le peptide fMLP, agoniste des FPRs, ANXA1<sub>2-26</sub> stimule l'invasion des cellules A375, M3Dau et WM1552c en Matrigel. Cependant, en présence de tBoc, antagoniste des FPRs, les effets du fMLP et d'ANXA1<sub>2-26</sub> sur l'invasion sont atténués. Ces données démontrent que l'effet pro-invasif d'ANXA1 est transduit par les FPRs. Chakravarti *et al* (195) ont également observé que les tumeurs primitives expriment significativement plus de FPRs que les lésions métastatiques. Cela suggère, avec les données obtenues dans notre étude *in vivo*, que l'interaction ANXA1-FPR joue principalement un rôle dans l'invasion précoce du mélanome cutané.

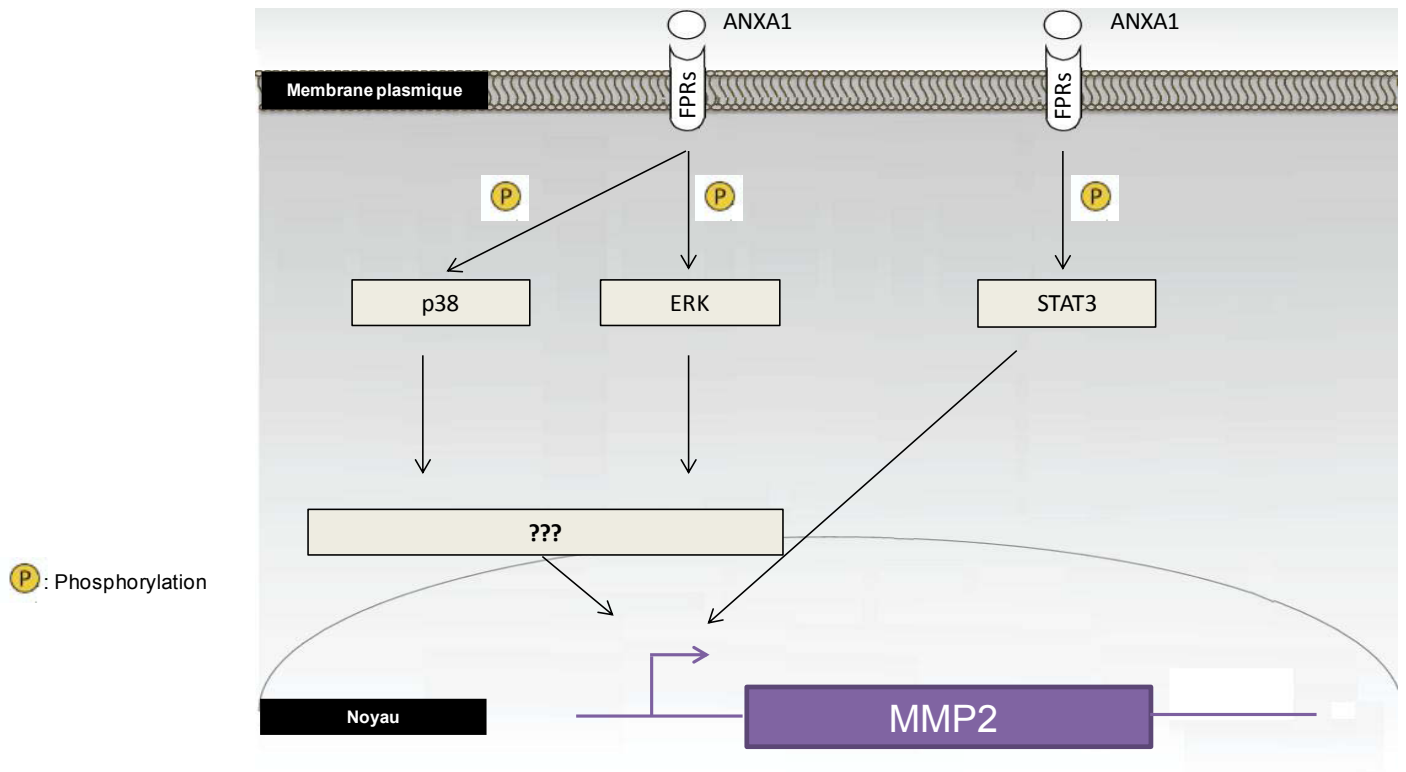
Le processus d'invasion cellulaire dépend d'une part de la motilité cellulaire qui est médiée principalement par les intégrines, d'autre part, par les protéases sécrétées qui permettent de dégrader les composants de la MEC et d'orienter l'invasion cellulaire. Les MMPs et en particulier les MMP2 ont été décrites comme des protéases clés dans l'invasion et dans la



transition de la phase RGP à la phase VGP du mélanome (167, 171). De plus, dans le cholangiocarcinome, la surexpression d'ANXA1 a été associée à une élévation de l'expression des MMP2 (315). Par zymographie, nous avons démontré que (1) l'inhibition de l'expression d'ANXA1 par siRNA dans les tumeurs B16Bl6 est associée à la diminution de l'activité des MMP2 et au nombre de métastases, (2) en présence d'ANXA1<sub>2-26</sub> ou de fMLP, dans 3 lignées cellulaires humaines de mélanome, l'activité des MMP2 est augmentée alors qu'en présence de tBoc cette activité est diminuée. Ces résultats démontrent qu'ANXA1 stimule l'invasion cellulaire et la propagation du mélanome, en moins, par l'activation des MMP2.

Nous avons donc voulu identifier les voies de signalisation intracellulaires faisant le lien entre la stimulation des FPRs par ANXA1 et l'activation des MMP2. Il a été démontré que le gène de MMP2 est sous le contrôle des voies MAPK et JAK/STAT3 (74, 93, 316). Puisque ces voies peuvent être stimulées par les FPRs, nous avons analysé le degré de phosphorylation d'ERK, JNK, p38 et STAT3 (sur le résidu serine 727 et tyrosine 705) en présence d'ANXA1<sub>2-26</sub> et de fMLP. Pour les 3 lignées cellulaires testées, l'activation des FPRs par ANXA1<sub>2-26</sub> ou fMLP stimule la phosphorylation d'ERK, p38 et STAT3 (sur la tyrosine 705), et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces protéines inhibe l'activation des MMP2 par ANXA1<sub>2-26</sub>. Ces résultats permettent de conclure que ces voies participent à la transduction du signal permettant d'activer les MMP2 suite à la stimulation des FPRs. FPR2, récepteur d'ANXA1, est connu pour sa capacité à induire des signaux biologiques opposés. Les propriétés anti-inflammatoires d'ANXA1 et de LXA4 (lipoxin A4), qui induisent l'apoptose des neutrophiles et l'efferocytose des macrophages, sont induites par FPR2 (317-319). De plus, les effets pro-inflammatoires de cathelicidin-associated antimicrobial peptide (LL-37) et de serum amyloid protein A (SAA) sont induits par le même récepteur et permettent l'activation des leucocytes et leur recrutement au niveau du site d'inflammation (320-322). Une étude récente s'est focalisé sur ce point et a démontré que FPR2 peut se trouver sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec FPR1 ou FPR3. Selon le dimère formé, des voies de signalisation spécifiques sont engagées suite à l'activation de FPR2 par un agoniste. En particulier, l'hétérodimère FPR1/FPR2 est l'unique dimère capable d'activer la kinase JNK (323). Dans notre étude, nous avons observé que la phosphorylation de JNK en présence d'ANXA1<sub>2-26</sub> ou de fMLP se produit uniquement dans la lignée M3Dau. Cela suggère que, contrairement à A375 et WM1552c, la formation de l'hétérodimère FPR1/FPR2 à la surface des cellules M3Dau est possible.





**Figure 1: schéma des voies de signalisation activées par ANXA1**

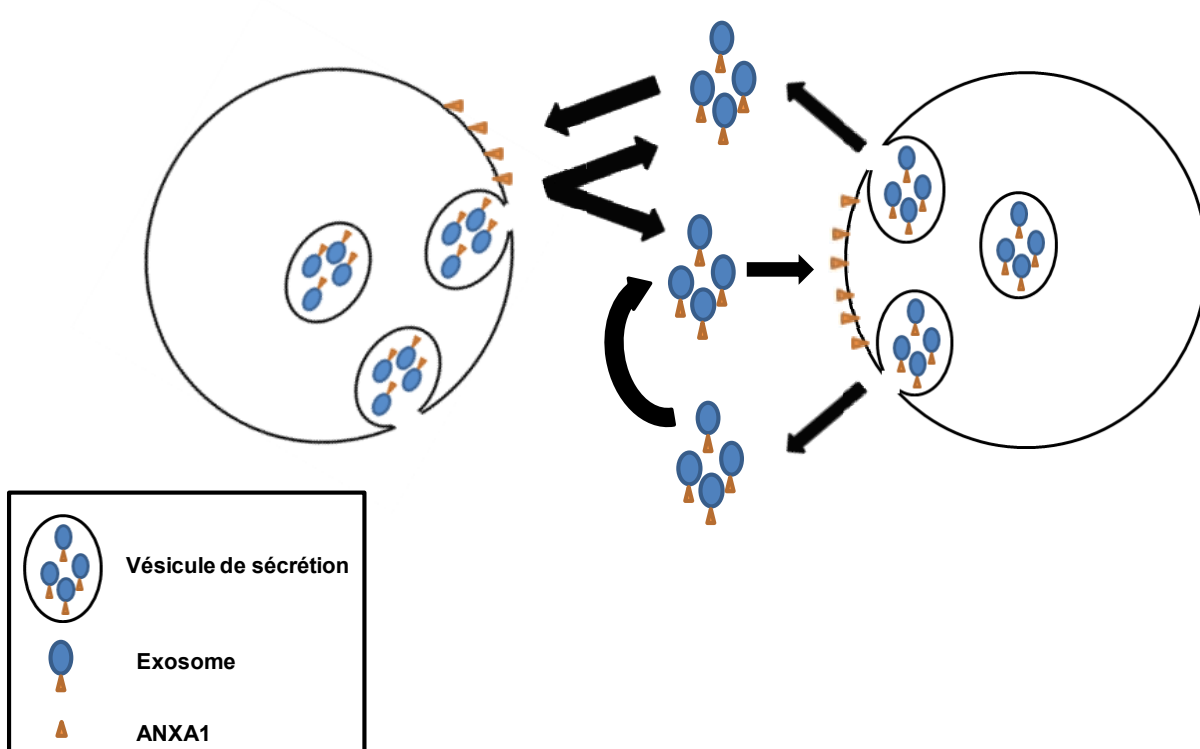
La fixation d'ANXA1 sur les FPRs induit la voie STAT3 et la voie MAPK (p38 et ERK). L'activation de ces voies va stimuler l'expression et la sécrétion des MMP2.

Il est déjà établi que STAT3 est phosphorylé par la kinase JAK sur la tyrosine 705. Cette phosphorylation induit la dimérisation et la translocation nucléaire de STAT3 (324). Au niveau nucléaire, STAT3 se lie au promoteur du gène MMP2 et stimule sa transcription (93). STAT3 possède un deuxième site de phosphorylation (serine 727) qui dépend de la phosphorylation d'ERK et de p38 (325, 326). Quand cette phosphorylation se produit, l'activité transcriptionnelle de STAT3 est augmentée (326). Puisqu'aucune modification du degré de phosphorylation de STAT3 sur la serine 727 n'a été observée en présence des agonistes des FPRs, l'activation des MMP2 pourrait se produire par le biais de deux voies. La voie JAK/STAT3 et une voie dépendante d'ERK et de p38 (**Figure 1**). Cette hypothèse est renforcée par l'observation que l'inhibition d'ERK, p38 et STAT3 a un effet plus marqué sur l'activité des MMP2 que l'inhibition de STAT3 seule.

## **II- Mode d'action d'ANXA1**

### **1) Externalisation d'ANXA1**

Pour qu'ANXA1 puisse interagir avec les FPRs qui sont à la surface des cellules, il faut qu'elle soit externalisée. Il est établi qu'ANXA1 est une protéine qui se lie à la membrane de façon  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante. La fonction biologique de la protéine est portée par sa partie N-terminale, et son interaction avec les FPRs se fait par le biais de son domaine N-terminal. Sous sa forme soluble, et donc non liée à la membrane, le domaine N-terminal est enfoui au niveau du cœur de la protéine et n'est pas accessible pour interagir avec son récepteur. Cependant, nous avons observé qu'ANXA1 est sécrétée par les trois lignées cellulaires étudiées (A375, M3Dau et WM1552c). De plus, nous avons observé une relation entre ANXA1 extracellulaire et le pouvoir invasif des lignées étudiées. Sachant que le milieu conditionné contient aussi bien des protéines sécrétées que des exosomes, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'ANXA1 observée correspond à une forme exosomale. En effet, la même observation a été effectuée lors d'une étude des protéines exosomales de lignées cellulaires de mélanome au pouvoir invasif différent, les exosomes provenant d'une lignée cellulaire de mélanome hautement invasive contiennent significativement plus d'ANXA1 que ceux d'une lignée peu invasive (327). Par ailleurs, il a été montré qu'ANXA1 peut se trouver à la surface des exosomes et qu'après sécrétion et fusion des exosomes avec la membrane plasmique cellulaire, ANXA1 peut se trouver à la surface des cellules (328, 329). Ce mécanisme pourrait expliquer le mode d'externalisation d'ANXA1 depuis le cytoplasme jusqu'aux surfaces cellulaires dans les cellules de mélanome (**Figure 2**). Le même mécanisme



**Figure 2: schéma hypothétique de l'externalisation d'ANXA1**

ANXA1 se trouve à la surface des exosomes. Après fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane cytoplasmique, les exosomes sont sécrétés. Après la fusion des exosomes aux membranes cytoplasmiques des cellules sécrétrices ou des cellules environnantes, ANXA1 se trouve à la surface cellulaire.

a été attribué pour l'externalisation d'ANXA6 dans des lignées cellulaires de cancer du sein (305).

## 2) Interaction d'ANXA1 endogène avec les FPRs

Par des approches protéomiques nous avons montré, dans différentes lignées de mélanome, qu'ANXA1 peut se trouver sous une forme clivée dans sa partie N-terminale. En utilisant la propriété d'ANXA1 à se lier aux membranes phospholipidiques de façon  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante, nous avons montré dans la lignée A375 qu'ANXA1 peut être localisée à la surface des cellules, et qu'ANXA1 clivée n'est présente qu'au niveau membranaire. Cela suggère que:

- ANXA1 entière peut interagir de façon juxtacrine avec les FPRs des cellules environnantes.
- un clivage pourrait se produire pour libérer un peptide pro-invasif et interagir de façon paracrine avec les FPRs des cellules distantes.

Afin de caractériser ce clivage, nous avons soumis la protéine clivée de deux lignées de mélanome à une dégradation d'Edman. Dans les deux lignées, le clivage d'ANXA1 se produit après la serine 28. A notre connaissance, ce site de clivage d'ANXA1 n'a jamais été décrit. Par des approches biochimiques, nous avons montré que ce clivage est réalisé par une sérine protéase membranaire. Après fractionnement des protéines membranaires en 21 fractions, nous avons mis en évidence une activité protéolytique d'ANXA1 dans 5 fractions. Les identifications par LC-MS/MS ont révélé la présence d'une protéase membranaire, la nicaline, dans 3 des 5 fractions analysées. La nicaline est une protéine qui a été identifiée en 2004 par comparaison de séquence avec la nicastrine (308). La nicastrine est un composant du complexe gamma-sécrétase. Ce complexe clive Notch, lorsqu'il est activé, au niveau membranaire (330). Il permet aussi le clivage de l'amyloid precursor protein (APP) et la libération du peptide amyloid (Ab) qui va s'accumuler au niveau du cerveau de patients atteints d'Alzheimer (331, 332). Bien que la nicastrine possède un domaine amino peptidase, son rôle dans le complexe gamma-sécrétase est d'assurer l'assemblage des différents composants (330). La nicaline présente une homologie de séquence avec la nicastrine au niveau du domaine aminopeptidase. Cependant, le rôle qui lui a été attribué jusqu'à présent, est la formation d'un complexe avec NOMO. Le complexe nicaline/NOMO a été identifié, dans le zebrafish, comme un antagoniste de la voie de signalisation Nodal pendant la



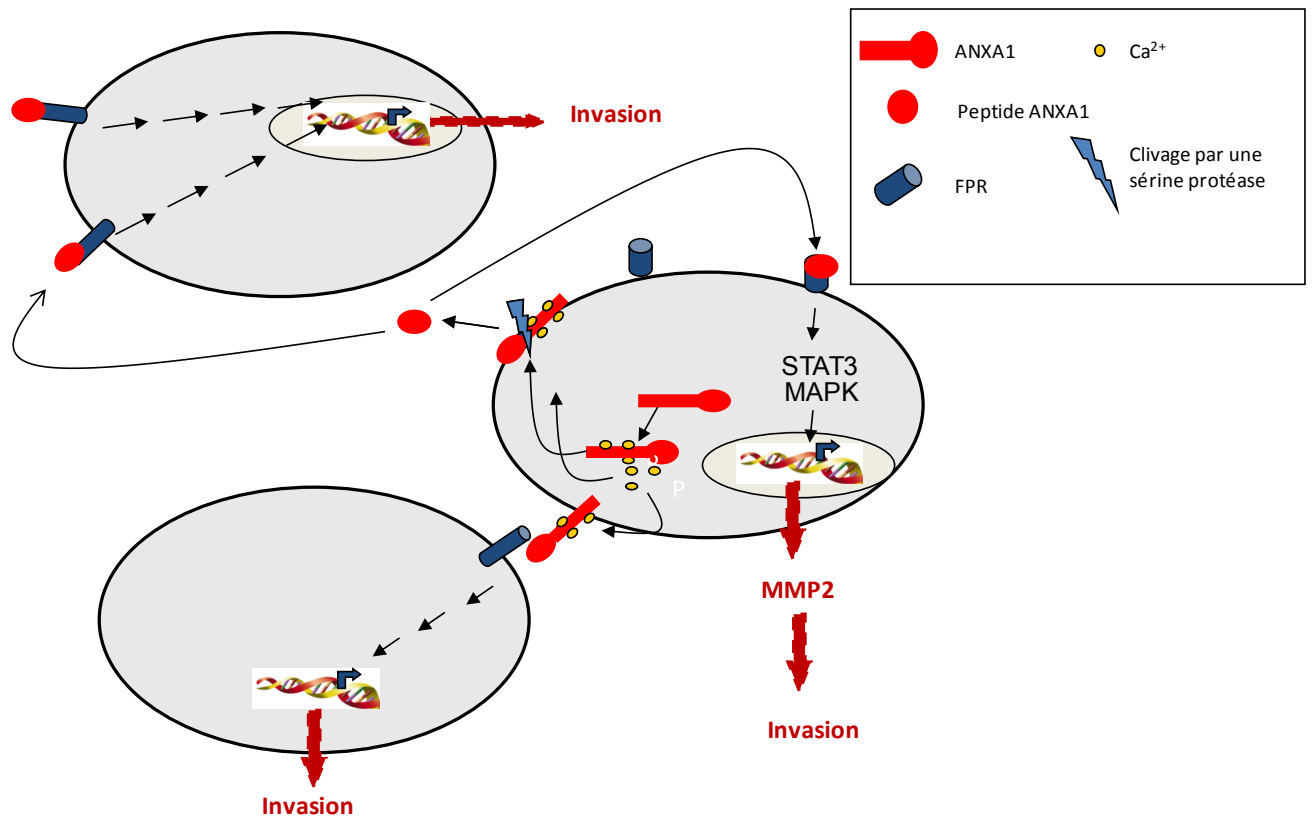
structuration du mésendoderme (308). L'activité protéolytique proprement dite mise en évidence dans le mélanome serait donc une fonction nouvelle pour la nicaline.

Des études supplémentaires pour documenter la présence de cette protéine dans les lignées de mélanome ainsi que les conséquences d'une incubation de celle-ci avec ANXA1 permettront de confirmer ou d'invalider cette possibilité. Lors d'une étude récente, il a été observé que la PR3 et l'élastase clivent l'extrémité N-terminale d'ANXA1 (ANXA1<sub>2-50</sub>) au niveau de plusieurs sites (333). Cela suggère que la détermination du site de clivage d'ANXA1 pourrait ne pas être suffisante pour déterminer la masse exacte du (des) peptide(s) libéré(s). La confirmation de l'implication de la nicaline dans le clivage d'ANXA1 pourrait être un outil très intéressant pour la détection du (des) peptide(s) ANXA1. En effet l'incubation de la protéase recombinante avec la fraction enrichie en ANXA1, dans un premier temps, nous permettra de déterminer la masse des peptides ANXA1 libérés et la recherche de ces masses, dans un deuxième, nous permettra de détecter ces peptides dans des échantillons biologiques (surnageant cellulaire, tumeurs.....).

Ces travaux ont montré qu'ANXA1 a une valeur pronostique du mélanome cutané. La compréhension de son mode d'action et l'identification des voies de signalisation qu'elle gouverne ouvrent des perspectives pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. Au laboratoire, différentes stratégies de vectorisation pour la détection et le traitement du mélanome ont été développées. Parmi ces vecteurs, différentes molécules ciblant efficacement la mélanine ont été synthétisées. Coupler ces vecteurs avec des inhibiteurs de la nicaline ou avec le tBoc ou encore avec un anticorps anti ANXA1 serait intéressant pour tester la valeur thérapeutique d'ANXA1 dans modèle pré-clinique.

### **III- Conclusions**

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'implication d'ANXA1 dans l'invasion du mélanome cutané. ANXA1 peut être externalisée à la surface des cellules de mélanome où elle peut interagir de façon juxtacrine avec les FPRs des cellules avoisinantes. ANXA1 peut être clivée par une sérine protéase membranaire permettant la libération d'un peptide pro-invasif qui pourrait agir de façon paracrine avec les FPRs des cellules distantes. Les différentes approches cherchant à mettre en évidence le peptide ANXA1<sub>2-26</sub> ainsi que d'autres peptides N-terminaux n'ont pas été concluantes. Nous avons identifié un site non décrit jusqu'alors après la sérine 28, la recherche du peptide correspondant devra être entreprise.



**Figure 3: Mode d'action d'ANXA1 pour la stimulation de l'invasion cellulaire**

ANXA1 est externalisée à la surface cellulaire. Sous sa forme entière elle interagit de façon juxtacrine avec les FPRs des cellules voisines. Le clivage d'ANXA1 par une sérine protéase membranaire permettrait de libérer un peptide pro-invasif qui va interagir de façon autocrine et paracrine avec les FPRs.

Nos résultats montrent cependant que l'interaction d'ANXA1 extracellulaire, mimée par le peptide ANXA1<sub>2-26</sub>, avec les FPRs induit la voie MAPK et STAT3 qui vont par la suite augmenter l'activité des MMP2 extracellulaires. Les MMP2 vont permettre la dégradation de la MEC et l'invasion cellulaire.

L'ensemble de ces résultats constitue un argument pour prouver l'intérêt d'ANXA1 comme éventuel marqueur pronostique, capable d'indiquer à un stade précoce le potentiel invasif de la tumeur. Le site de clivage mis en évidence pourra également envisager de nouvelles investigations en spectrométrie de masse pour mettre en évidence le peptide ainsi généré. Ces résultats suggèrent aussi l'intérêt d'utiliser ANXA1 comme une cible thérapeutique visant à bloquer l'invasion du derme avant l'apparition des métastases.

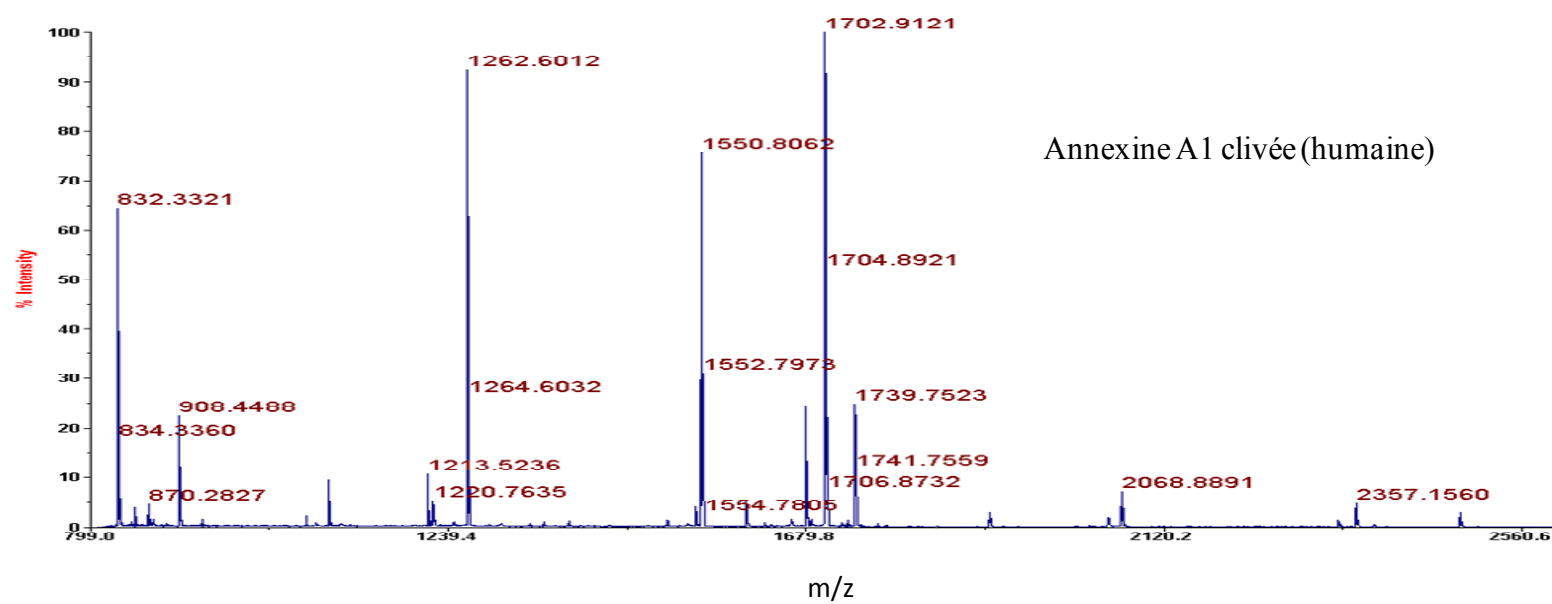
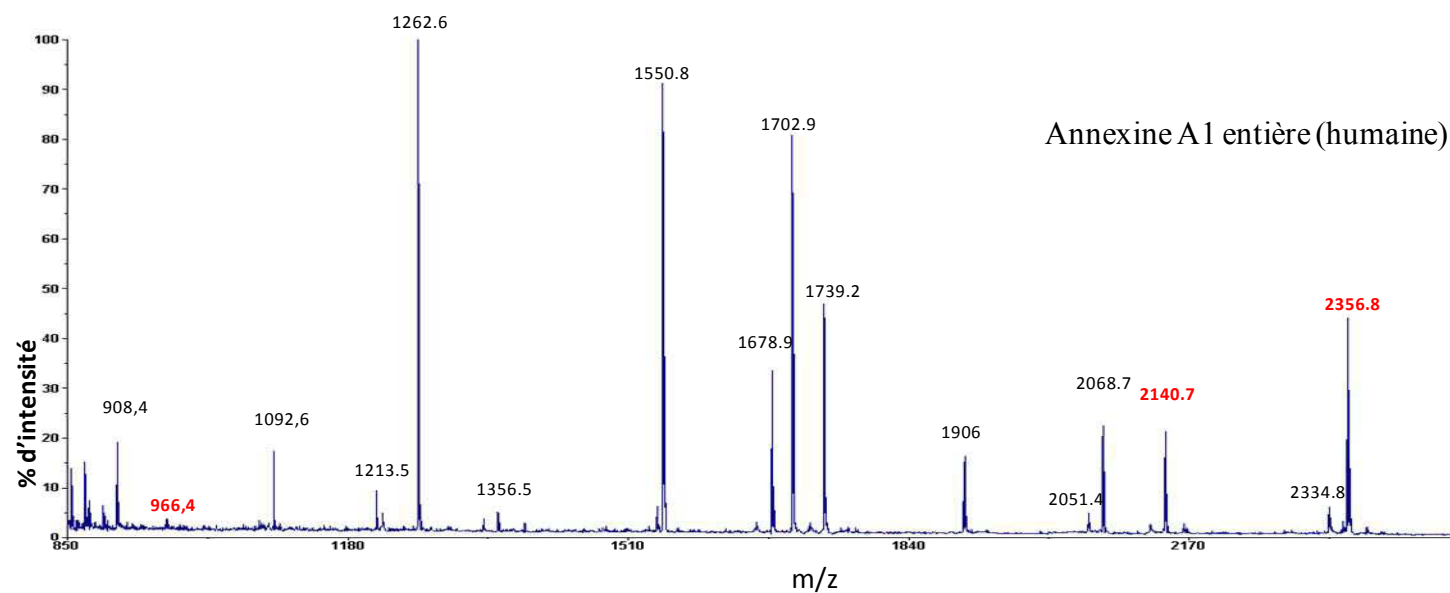
L'ensemble de ces travaux confortent le rôle dynamique de la matrice extracellulaire sur le comportement des cellules ; dans le cas particulier du mélanome l'invasion du derme, dépend de la dégradation du collagène IV, qui peut être clivé par les MMP2. La présence de peptides ANXA1 ou de la protéine elle-même, peut participer au processus d'invasion précoce du mélanome. De nombreuses autres protéines de la MEC sont également des acteurs de ce mécanisme, il s'agit de protéines sécrétées, ou encore localisées dans les exosomes ou encore participant au dégradome. Les peptides en interagissant avec des partenaires membranaires peuvent en effet induire de nombreuses modifications en termes de prolifération ou encore de forme cellulaire. La compréhension des mécanismes d'invasion doit comprendre l'étude du peptidome extracellulaire (matrisome) et/ou du dégradome. C'est dans ce contexte que les peptides de l'annexine A1 mais également d'autres annexines (annexine A6) pourraient être spécifiquement étudiés.





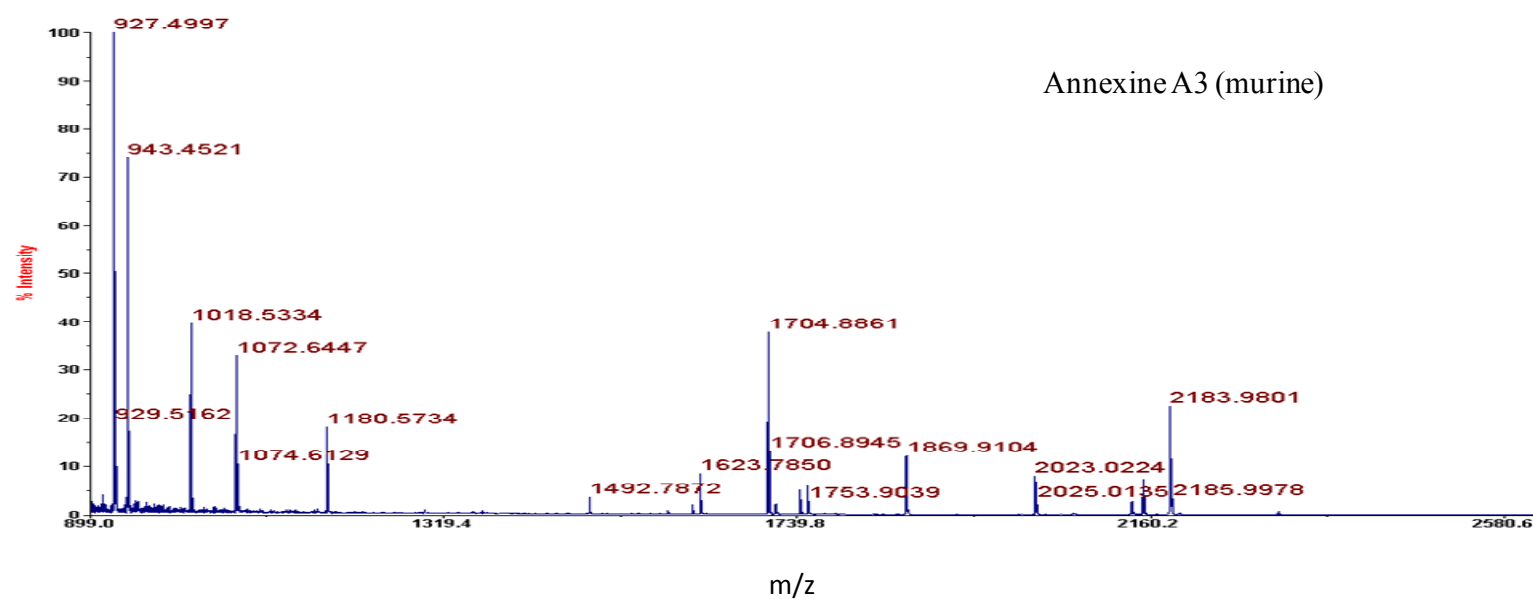
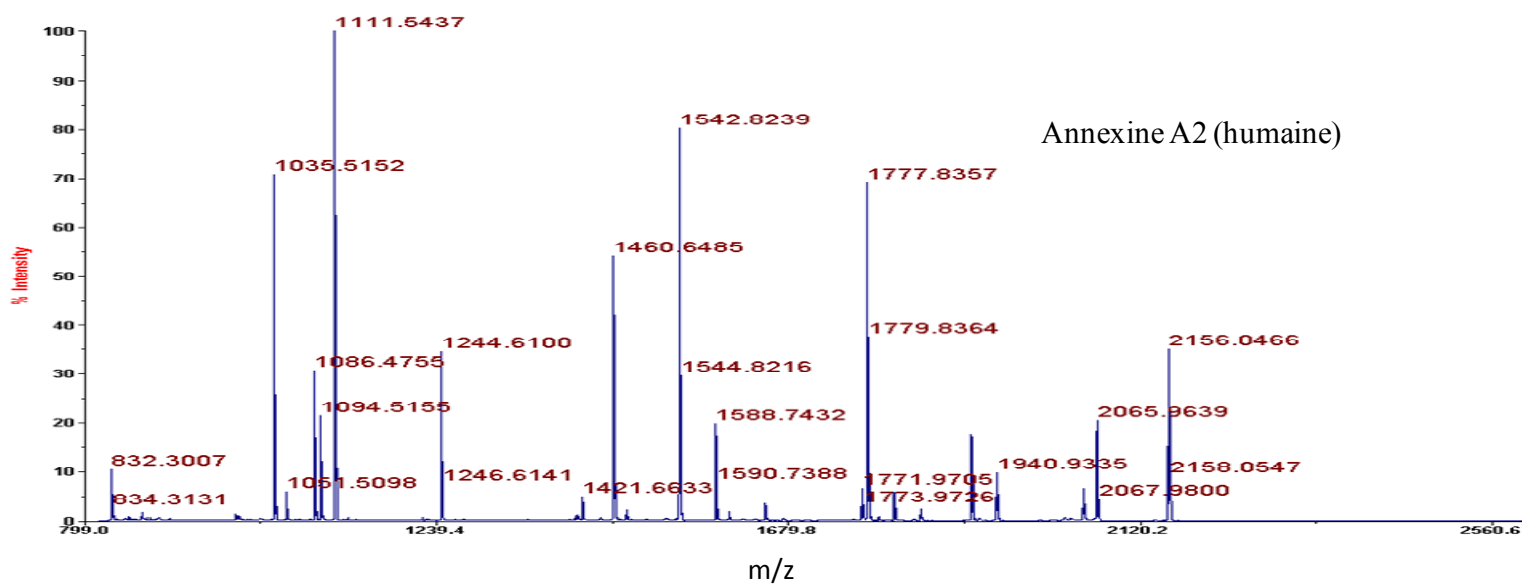
# ANNEXES





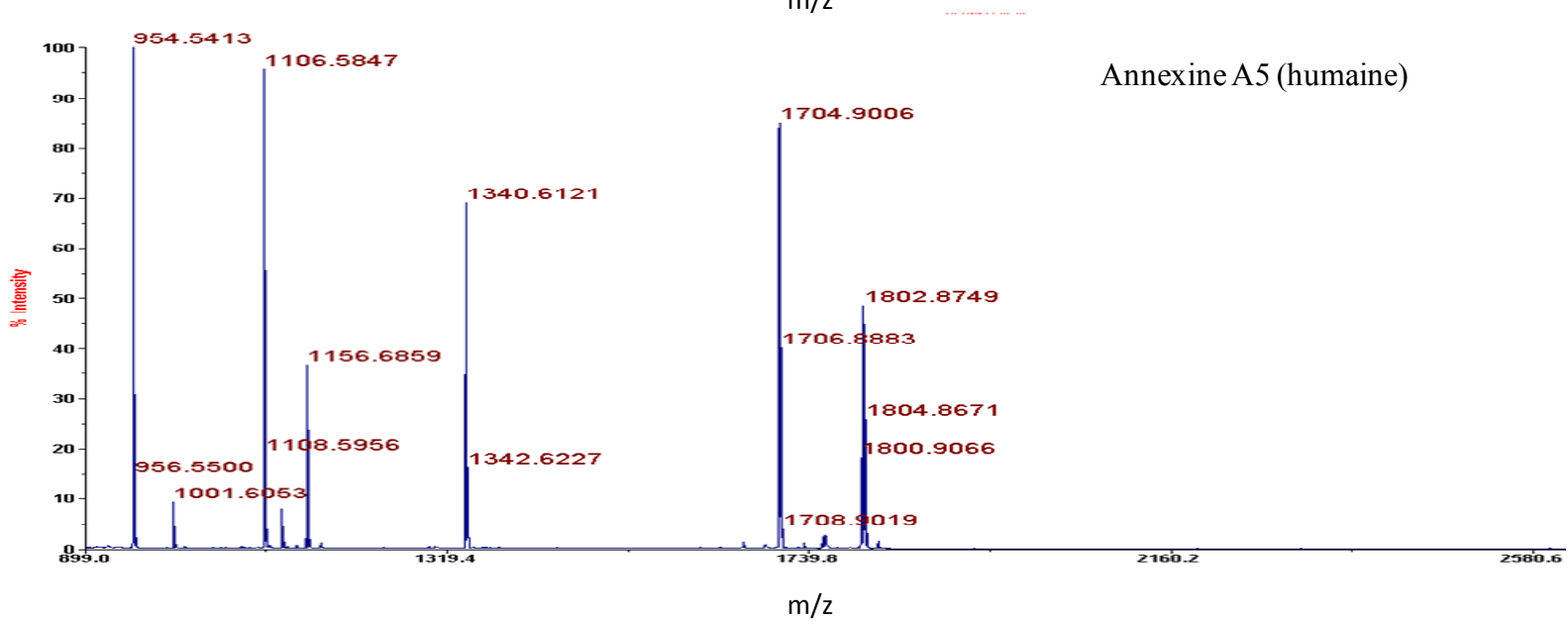
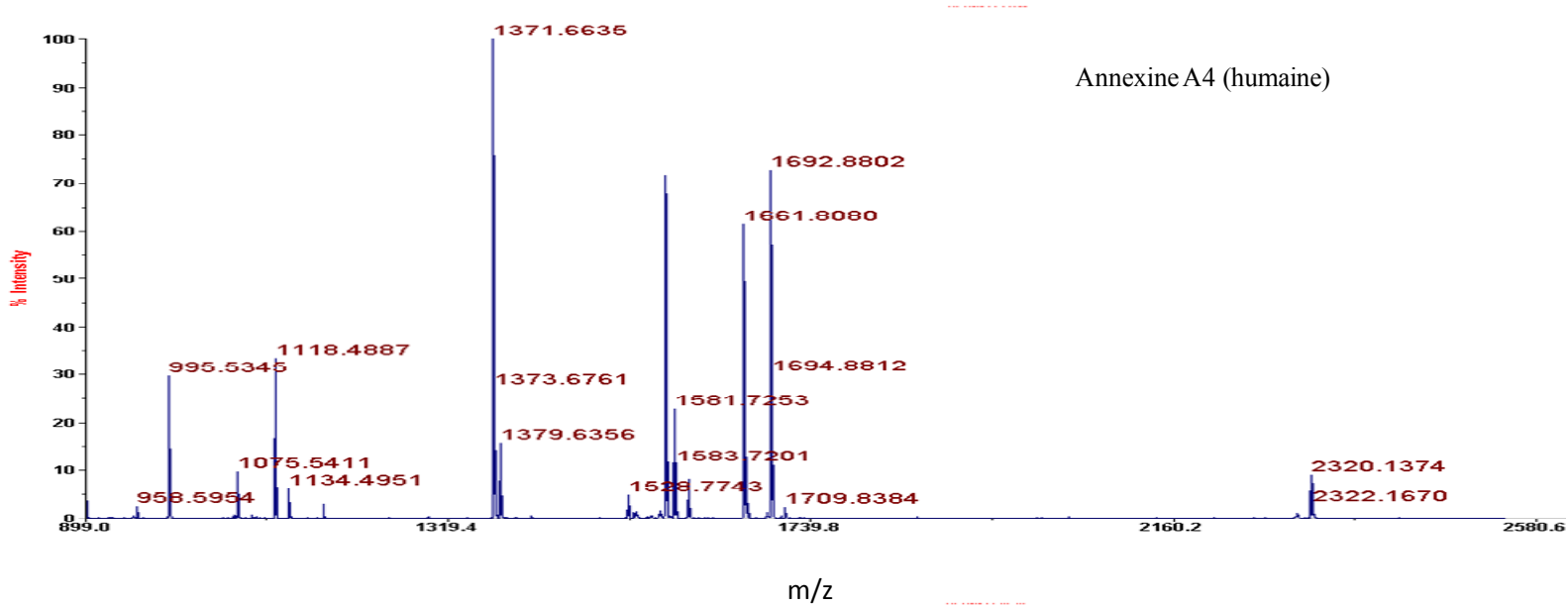
Annexe 1 : Identification d'ANXA1 entière et clivée par MALDI-TOF/MS





## Annexe 2 : Identification d'ANXA2 et d'ANXA3 par MALDI-TOF/MS

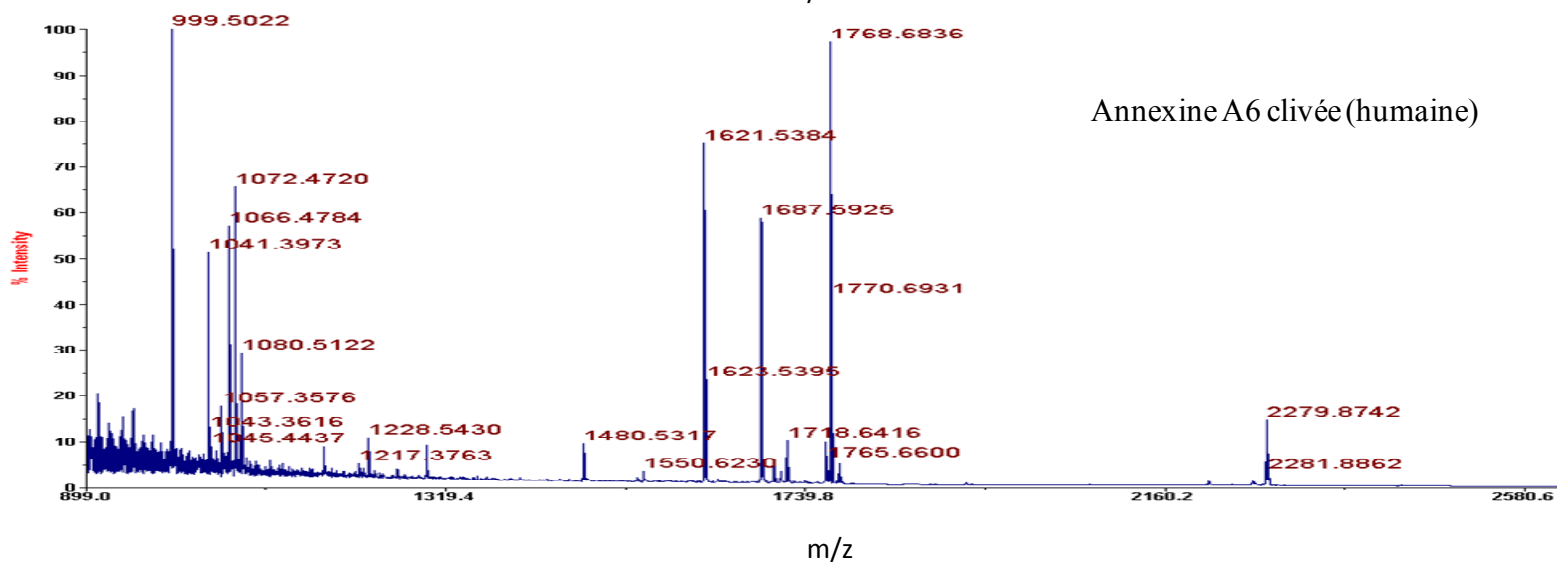
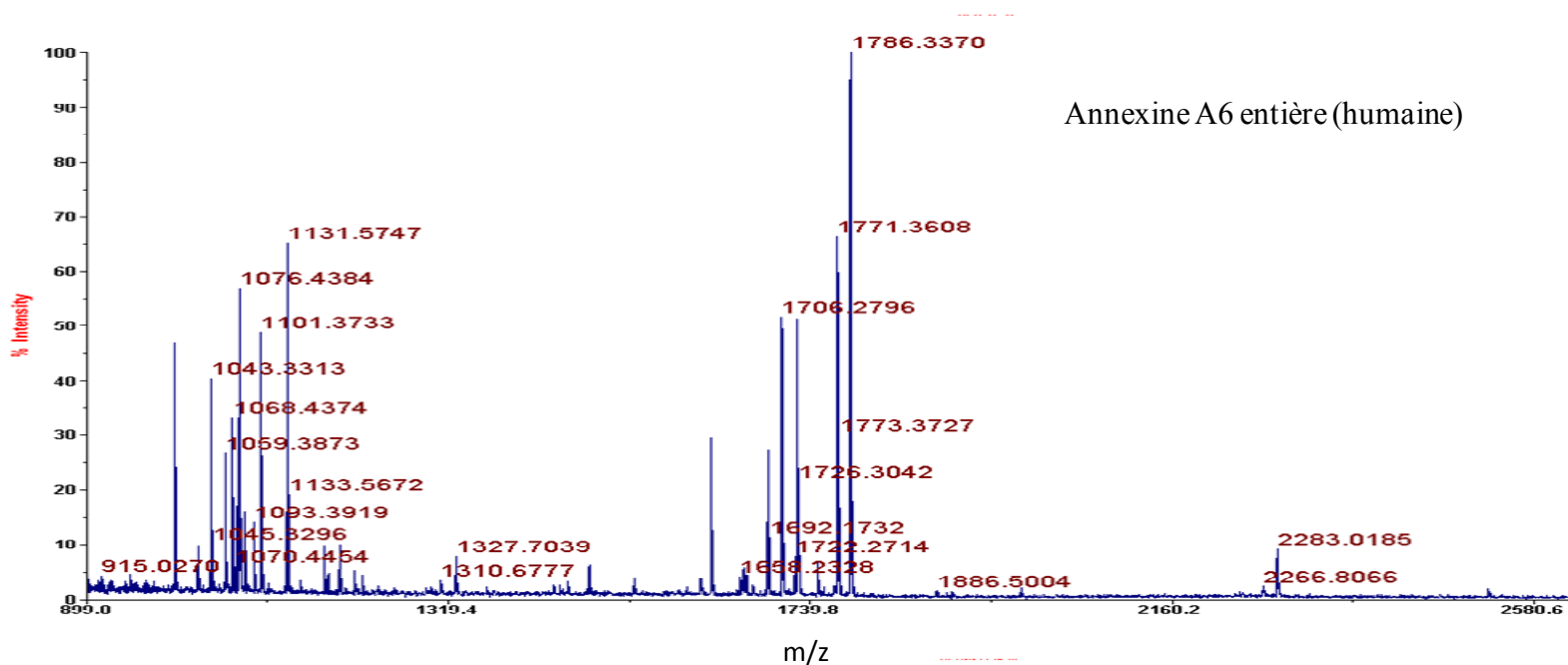




Annexe 3 : Identification d'ANXA4 et d'ANXA5 par MALDI-TOF/MS

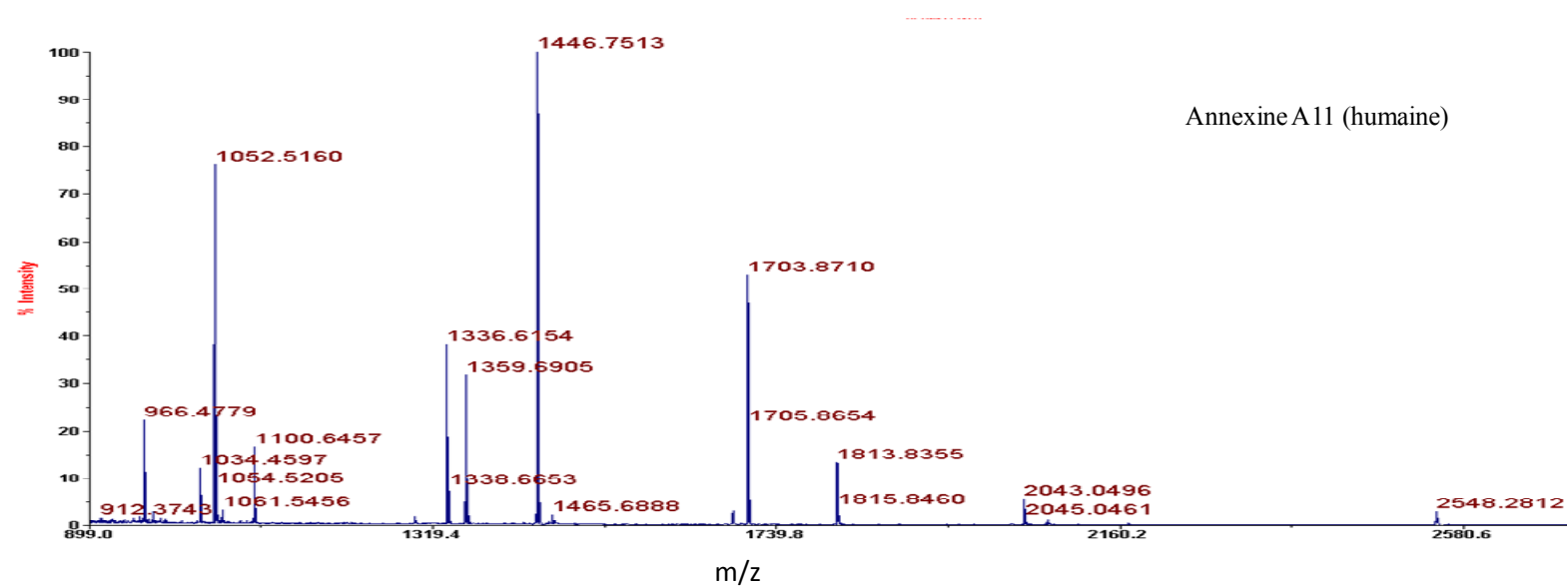
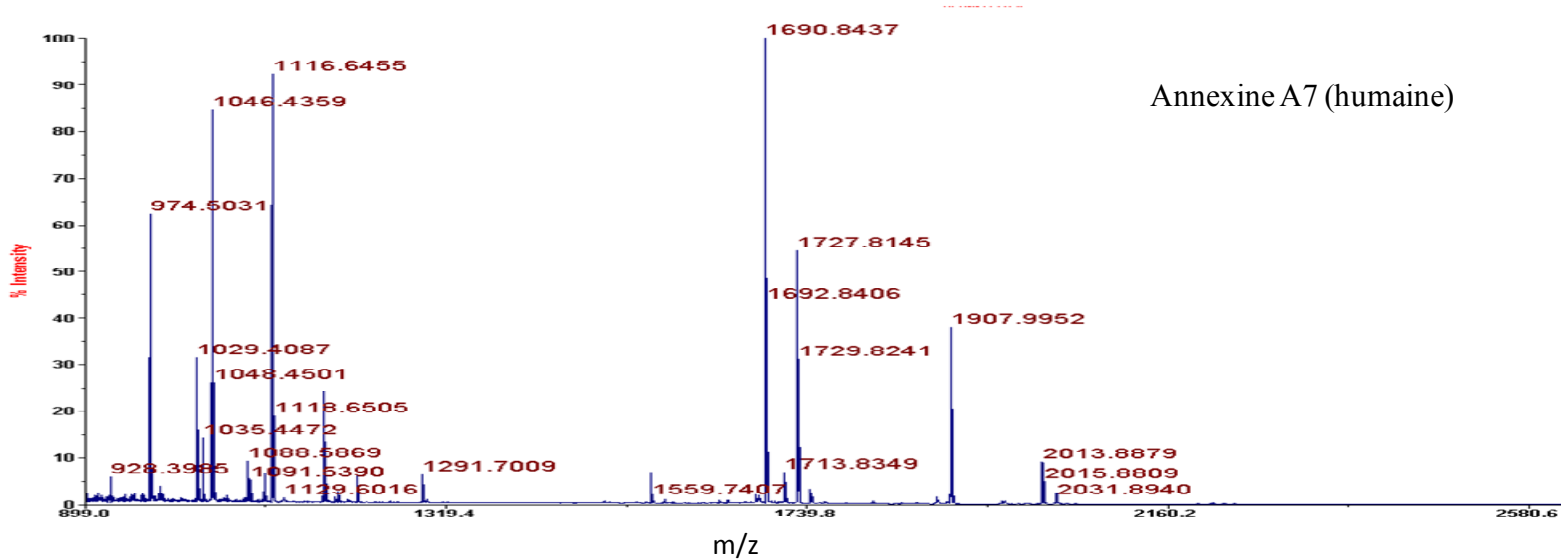






Annexe 4 : Identification d'ANXA6 entière et tronquée par MALDI-TOF/MS





**Annexe 5 :** Identification d'ANXA7 et d'ANXA11 par MALDI-TOF/MS



Fraction 9

Accession	Description	SCoverage	Σ# Peptides	Σ# PSMs	Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
K7EMW4	Nicalin OS=Homo sapiens	4,09	1	1	45,15	4,09	1	1	489	54,8	7,49
	Sequence	# PSMs	Protein Group Accessions	Modifications	MH + [Da]	A2	IonScore A2	Exp Value A2			
	QTQAASASQGSASAAEVL R	1	K7EMW4		1946,86057	High	45	0,022788184			

Fraction 10

Accession	Description	SCoverage	Σ# Peptides	Σ# PSMs	Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
K7EMW4	Nicalin OS=Homo sapiens	10,22	3	5	156,83	10,22	3	4	489	54,8	7,49
	Sequence	# PSMs	Protein Group Accessions	Modifications	MH + [Da]	A2	IonScore A2	Exp Value A2			
	QTQAASASQGSASAAEVL R	3	K7EMW4		1946,69390	High	58	0,00118909			
	TATANGFQW/TSGVQSK	1	K7EMW4		1727,68732	High	48	0,01332715			
	AVSDWLLASVEGR	1	K7EMW4		1403,17756	High	44	0,030497052			

Fraction 11

Accession	Description	SCoverage	Σ# Peptides	Σ# PSMs	Score A2	Coverage A2	# Peptides A2	# PSM A2	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
K7EMW4	Nicalin OS=Homo sapiens	4,09	1	1	45,15	4,09	1	1	489	54,8	7,49
	Sequence	# PSMs	Protein Group Accessions	Modifications	MH + [Da]	A2	IonScore A2	Exp Value A2			
	QTQAASASQGSASAAEVL R	1	K7EMW4		1946,86057	High	45	0,022788184			

Annexe 6 : Mise en évidence de la nicaline dans les fractions 9,10 et 11 par LC/MS-MS



# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**





1. Tobin DJ (2006) Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chem Soc Rev* 35(1):52-67.
2. Elias PM (2005) Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 125(2):183-200.
3. Cotsarelis G, Sun TT, & Lavker RM (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61(7):1329-1337.
4. Ito M, *et al.* (2005) Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 11(12):1351-1354.
5. Costin GE & Hearing VJ (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb J* 21(4):976-994.
6. Raposo G & Marks MS (2007) Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10):786-797.
7. Sturm RA (2006) A golden age of human pigmentation genetics. *Trends Genet* 22(9):464-468.
8. Chi A, *et al.* (2006) Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res* 5(11):3135-3144.
9. Delevoye C, Giordano F, van Niel G, & Raposo G (2011) [Biogenesis of melanosomes - the chessboard of pigmentation]. *Med Sci (Paris)* 27(2):153-162.
10. Ito S & Wakamatsu K (2008) Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol* 84(3):582-592.
11. Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, & Ito S (2009) Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 22(5):563-579.
12. Videira IF, Moura DF, & Magina S (2013) Mechanisms regulating melanogenesis\*. *An Bras Dermatol* 88(1):76-83.
13. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, & Stratigos AJ (2011) Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. *Photochem Photobiol* 87(5):978-987.
14. Wan P, Hu Y, & He L (2011) Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. *Mol Cell Biochem* 354(1-2):241-246.
15. Haass NK & Herlyn M (2005) Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Invest Dermatol Symp Proc* 10(2):153-163.
16. Agar N & Young AR (2005) Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutat Res* 571(1-2):121-132.
17. Maddodi N, Jayanthi A, & Setaluri V (2012) Shining light on skin pigmentation: the darker and the brighter side of effects of UV radiation. *Photochem Photobiol* 88(5):1075-1082.
18. Hyter S, *et al.* (2012) Endothelin-1 is a transcriptional target of p53 in epidermal keratinocytes and regulates ultraviolet-induced melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 26(2):247-258.
19. Nakajima H, Wakabayashi Y, Wakamatsu K, & Imokawa G (2011) An extract of Melia toosendan attenuates endothelin-1-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through the interruption of PKC activity within melanocytes. *Arch Dermatol Res* 303(4):263-276.
20. Tabone-Eglinger S, Wehrle-Haller M, Aebischer N, Jacquier MC, & Wehrle-Haller B (2012) Membrane-bound Kit ligand regulates melanocyte adhesion and survival, providing physical interaction with an intraepithelial niche. *Faseb J* 26(9):3738-3753.
21. Gordon R (2013) Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. *Semin Oncol Nurs* 29(3):160-169.
22. Garbe C & Eigentler TK (2007) Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res* 17(2):117-127.
23. Balch CM, *et al.* (2001) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19(16):3635-3648.



24. Kreiseder B, *et al.* (2013) alpha-Catulin downregulates E-cadherin and promotes melanoma progression and invasion. *Int J Cancer* 132(3):521-530.
25. Fidler IJ (2002) Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* 12(2):89-96.
26. Fidler IJ, Kim SJ, & Langley RR (2007) The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. *J Cell Biochem* 101(4):927-936.
27. Miller AJ & Mihm MC, Jr. (2006) Melanoma. *N Engl J Med* 355(1):51-65.
28. Prior IA & Hancock JF (2012) Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin Cell Dev Biol* 23(2):145-153.
29. Lau KS & Haigis KM (2009) Non-redundancy within the RAS oncogene family: insights into mutational disparities in cancer. *Mol Cells* 28(4):315-320.
30. Whitwam T, *et al.* (2007) Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene* 26(31):4563-4570.
31. Santarpia L, Lippman SM, & El-Naggar AK (2012) Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16(1):103-119.
32. Wellbrock C, Karasarides M, & Marais R (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11):875-885.
33. Salama AK & Flaherty KT (2013) BRAF in Melanoma: Current Strategies and Future Directions. *Clin Cancer Res* 19(16):4326-4334.
34. Wan PT, *et al.* (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116(6):855-867.
35. Pollock PM, *et al.* (2003) High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33(1):19-20.
36. Davies H, *et al.* (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892):949-954.
37. Christensen C & Guldberg P (2005) Growth factors rescue cutaneous melanoma cells from apoptosis induced by knockdown of mutated (V 600 E) B-RAF. *Oncogene* 24(41):6292-6302.
38. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, & Haluska FG (2006) Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 126(1):154-160.
39. Tschandl P, *et al.* (2013) NRAS and BRAF mutations in melanoma-associated nevi and uninvolved nevi. *PLoS One* 8(7):e69639.
40. Yazdi AS, *et al.* (2003) Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 121(5):1160-1162.
41. Michaloglou C, *et al.* (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436(7051):720-724.
42. Sala E, *et al.* (2008) BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 6(5):751-759.
43. Hauschild A, *et al.* (2012) Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380(9839):358-365.
44. Weinstein IB & Joe A (2008) Oncogene addiction. *Cancer Res* 68(9):3077-3080; discussion 3080.
45. Jazirehi AR, Wenn PB, & Damavand M (2012) Therapeutic implications of targeting the PI3Kinase/AKT/mTOR signaling module in melanoma therapy. *Am J Cancer Res* 2(2):178-191.
46. Zhao L & Vogt PK (2008) Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27(41):5486-5496.
47. Curtin JA, Stark MS, Pinkel D, Hayward NK, & Bastian BC (2006) PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma. *J Invest Dermatol* 126(7):1660-1663.
48. Shull AY, *et al.* (2012) Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One* 7(8):e43369.
49. Todd JR, Scurr LL, Becker TM, Kefford RF, & Rizos H (2012) The MAPK pathway functions as a redundant survival signal that reinforces the PI3K cascade in c-Kit mutant melanoma. *Oncogene*.



50. Stahl JM, *et al.* (2004) Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 64(19):7002-7010.
51. Giles RH, van Es JH, & Clevers H (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653(1):1-24.
52. Vaid M, Prasad R, Sun Q, & Katiyar SK (2011) Silymarin targets beta-catenin signaling in blocking migration/invasion of human melanoma cells. *PLoS One* 6(7):e23000.
53. Hseu YC, *et al.* (2012) The Antitumor Activity of *Antrodia camphorata* in Melanoma Cells: Modulation of Wnt/beta-Catenin Signaling Pathways. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:197309.
54. Dahl C & Guldberg P (2007) The genome and epigenome of malignant melanoma. *Apmis* 115(10):1161-1176.
55. Worm J, Christensen C, Gronbaek K, Tulchinsky E, & Guldberg P (2004) Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene* 23(30):5215-5226.
56. Goldstein AM, *et al.* (2007) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 44(2):99-106.
57. Nelson AA & Tsao H (2009) Melanoma and genetics. *Clin Dermatol* 27(1):46-52.
58. Chudnovsky Y, Adams AE, Robbins PB, Lin Q, & Khavari PA (2005) Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet* 37(7):745-749.
59. Rother J & Jones D (2009) Molecular markers of tumor progression in melanoma. *Curr Genomics* 10(4):231-239.
60. Goldstein AM, *et al.* (2006) High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 66(20):9818-9828.
61. Ward KA, Lazovich D, & Hordinsky MK (2012) Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 67(5):1055-1067.
62. Curtin JA, *et al.* (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353(20):2135-2147.
63. Muthusamy V, *et al.* (2006) Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45(5):447-454.
64. Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, & Zhang R (2013) The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res* 27(4):254-271.
65. Gwosdz C, *et al.* (2006) Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer* 118(3):577-582.
66. Ragnarsson-Olding BK, Karsberg S, Platz A, & Ringborg UK (2002) Mutations in the TP53 gene in human malignant melanomas derived from sun-exposed skin and unexposed mucosal membranes. *Melanoma Res* 12(5):453-463.
67. Gembarska A, *et al.* (2012) MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med* 18(8).
68. Jean D, *et al.* (1998) Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J Biol Chem* 273(26):16501-16508.
69. Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, & Bar-Eli M (1998) Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *Embo J* 17(15):4358-4369.
70. Tellez CS, *et al.* (2007) Quantitative analysis of melanocytic tissue array reveals inverse correlation between activator protein-2alpha and protease-activated receptor-1 expression during melanoma progression. *J Invest Dermatol* 127(2):387-393.
71. Melnikova VO & Bar-Eli M (2008) Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype. *Cancer Biol Ther* 7(7):997-1003.
72. Mobley AK, Braeuer RR, Kamiya T, Shoshan E, & Bar-Eli M (2012) Driving transcriptional regulators in melanoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 31(3-4):621-632.



73. Li H, Watts GS, Oshiro MM, Futscher BW, & Domann FE (2006) AP-2alpha and AP-2gamma are transcriptional targets of p53 in human breast carcinoma cells. *Oncogene* 25(39):5405-5415.
74. Melnikova VO, *et al.* (2010) CREB inhibits AP-2alpha expression to regulate the malignant phenotype of melanoma. *PLoS One* 5(8):e12452.
75. Dobroff AS, *et al.* (2009) Silencing cAMP-response element-binding protein (CREB) identifies CYR61 as a tumor suppressor gene in melanoma. *J Biol Chem* 284(38):26194-26206.
76. Leslie MC & Bar-Eli M (2005) Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment. *J Cell Biochem* 94(1):25-38.
77. Lopez-Bergami P, Lau E, & Ronai Z (2010) Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer* 10(1):65-76.
78. Shah M, *et al.* (2010) A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development. *PLoS Genet* 6(12):e1001258.
79. Gould Rothberg BE, *et al.* (2009) Melanoma prognostic model using tissue microarrays and genetic algorithms. *J Clin Oncol* 27(34):5772-5780.
80. Lau E & Ronai ZA (2012) ATF2 - at the crossroad of nuclear and cytosolic functions. *J Cell Sci* 125(Pt 12):2815-2824.
81. Bhoomik A, *et al.* (2008) Suppressor role of activating transcription factor 2 (ATF2) in skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(5):1674-1679.
82. Maekawa T, *et al.* (2007) Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol Cell Biol* 27(5):1730-1744.
83. Berger AJ, *et al.* (2003) Subcellular localization of activating transcription factor 2 in melanoma specimens predicts patient survival. *Cancer Res* 63(23):8103-8107.
84. Lau E, *et al.* (2012) PKCepsilon promotes oncogenic functions of ATF2 in the nucleus while blocking its apoptotic function at mitochondria. *Cell* 148(3):543-555.
85. Shih JY & Yang PC (2011) The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 32(9):1299-1304.
86. Hao L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, & Persad S (2012) Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br J Dermatol* 166(6):1184-1197.
87. Vannini I, *et al.* (2007) Short interfering RNA directed against the SLUG gene increases cell death induction in human melanoma cell lines exposed to cisplatin and fotemustine. *Cell Oncol* 29(4):279-287.
88. Wu X, *et al.* (2005) Cancer incidence patterns among adolescents and young adults in the United States. *Cancer Causes Control* 16(3):309-320.
89. Gupta PB, *et al.* (2005) The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 37(10):1047-1054.
90. Dhawan P, Singh AB, Ellis DL, & Richmond A (2002) Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. *Cancer Res* 62(24):7335-7342.
91. Wani AA, Jafarnejad SM, Zhou J, & Li G (2011) Integrin-linked kinase regulates melanoma angiogenesis by activating NF-kappaB/interleukin-6 signaling pathway. *Oncogene* 30(24):2778-2788.
92. Liu N, *et al.* (2012) MicroRNA-9 suppresses uveal melanoma cell migration and invasion through the NF-kappaB1 pathway. *Oncol Rep* 28(3):961-968.
93. Xie TX, *et al.* (2004) Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23(20):3550-3560.
94. Emeagi PU, *et al.* (2013) Downregulation of Stat3 in melanoma: reprogramming the immune microenvironment as an anticancer therapeutic strategy. *Gene Ther*.
95. Liu F, *et al.* (2013) Stat3-targeted therapies overcome the acquired resistance to vemurafenib in melanomas. *J Invest Dermatol* 133(8):2041-2049.





96. Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, & Bertolotto C (2010) Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res* 23(1):27-40.
97. Du J, *et al.* (2004) Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* 6(6):565-576.
98. Sauter ER, *et al.* (2002) Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 62(11):3200-3206.
99. Carreira S, Liu B, & Goding CR (2000) The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem* 275(29):21920-21927.
100. Vance KW, Carreira S, Brosch G, & Goding CR (2005) Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer Res* 65(6):2260-2268.
101. Dynek JN, *et al.* (2008) Microphthalmia-associated transcription factor is a critical transcriptional regulator of melanoma inhibitor of apoptosis in melanomas. *Cancer Res* 68(9):3124-3132.
102. Cerroni L, Soyer HP, & Kerl H (1995) bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 17(1):7-11.
103. Ramsay JA, From L, & Kahn HJ (1995) bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. *Mod Pathol* 8(2):150-154.
104. Selzer E, *et al.* (1998) Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 8(3):197-203.
105. Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, & Dixit VM (2000) ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 10(21):1359-1366.
106. Busca R, *et al.* (2005) Hypoxia-inducible factor 1{alpha} is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J Cell Biol* 170(1):49-59.
107. Liu F, Fu Y, & Meyskens FL, Jr. (2009) Mitf regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *J Invest Dermatol* 129(2):422-431.
108. McGill GG, Haq R, Nishimura EK, & Fisher DE (2006) c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage. *J Biol Chem* 281(15):10365-10373.
109. Mani SA, *et al.* (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133(4):704-715.
110. Sanchez-Martin M, *et al.* (2002) SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease. *Hum Mol Genet* 11(25):3231-3236.
111. Carreira S, *et al.* (2006) Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20(24):3426-3439.
112. Levy C, Khaled M, & Fisher DE (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12(9):406-414.
113. Garraway LA, *et al.* (2005) Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436(7047):117-122.
114. Wellbrock C & Marais R (2005) Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol* 170(5):703-708.
115. Goding C & Meyskens FL, Jr. (2006) Microphthalmic-associated transcription factor integrates melanocyte biology and melanoma progression. *Clin Cancer Res* 12(4):1069-1073.
116. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, & Marais R (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445(7130):851-857.
117. Hoek KS & Goding CR (2010) Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23(6):746-759.
118. Cheli Y, *et al.* (2011) Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30(20):2307-2318.



119. Harris TJ & Tepass U (2010) Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(7):502-514.
120. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, & Herlyn M (1996) Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1(2):188-194.
121. Hsu MY, *et al.* (2000) E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156(5):1515-1525.
122. Kuphal S, Palm HG, Poser I, & Bosserhoff AK (2005) Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res* 15(4):305-313.
123. Massoumi R, *et al.* (2009) Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med* 206(1):221-232.
124. Natali PG, Nicotra MR, Cavaliere R, Giannarelli D, & Bigotti A (1991) Tumor progression in human malignant melanoma is associated with changes in alpha 6/beta 1 laminin receptor. *Int J Cancer* 49(2):168-172.
125. Schadendorf D, Heidel J, Gawlik C, Suter L, & Czarnetzki BM (1995) Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J Natl Cancer Inst* 87(5):366-371.
126. Moretti S, Martini L, Berti E, Pinzi C, & Giannotti B (1993) Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesions. *Melanoma Res* 3(4):235-239.
127. Albelda SM, *et al.* (1990) Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50(20):6757-6764.
128. Van Belle PA, *et al.* (1999) Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi. *Hum Pathol* 30(5):562-567.
129. Springer TA (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57:827-872.
130. Liang S & Dong C (2008) Integrin VLA-4 enhances sialyl-Lewisx/a-negative melanoma adhesion to and extravasation through the endothelium under low flow conditions. *Am J Physiol Cell Physiol* 295(3):C701-707.
131. Schlesinger M, *et al.* (2012) The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives. *Thromb Res* 129(5):603-610.
132. Rice GE & Bevilacqua MP (1989) An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246(4935):1303-1306.
133. Okahara H, Yagita H, Miyake K, & Okumura K (1994) Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res* 54(12):3233-3236.
134. Kuphal S, Bauer R, & Bosserhoff AK (2005) Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24(2):195-222.
135. Lee N, Barthel SR, & Schatton T (2013) Melanoma stem cells and metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? *Lab Invest*.
136. Hsu AR, *et al.* (2007) Integrin alpha v beta 3 antagonists for anti-angiogenic cancer treatment. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2(2):143-158.
137. Hood JD & Cheresch DA (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2(2):91-100.
138. Yang Y, *et al.* (2003) Specific alpha v integrin receptors modulate K1735 murine melanoma cell behavior. *Biochem Biophys Res Commun* 308(4):814-819.
139. Rupp PA, Visconti RP, Czirok A, Cheresch DA, & Little CD (2008) Matrix metalloproteinase 2-integrin alpha(v)beta3 binding is required for mesenchymal cell invasive activity but not epithelial locomotion: a computational time-lapse study. *Mol Biol Cell* 19(12):5529-5540.
140. Jiao Y, *et al.* (2012) Matrix metalloproteinase-2 promotes alphavbeta3 integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin. *PLoS One* 7(7):e41591.



141. Vogetseder A, *et al.* (2013) alphav-Integrin isoform expression in primary human tumors and brain metastases. *Int J Cancer* 133(10):2362-2371.
142. Natali PG, Nicotra MR, Di Filippo F, & Bigotti A (1995) Expression of fibronectin, fibronectin isoforms and integrin receptors in melanocytic lesions. *Br J Cancer* 71(6):1243-1247.
143. Hieken TJ, *et al.* (1996) Beta3 integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis. *J Surg Res* 63(1):169-173.
144. Natali PG, *et al.* (1997) Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 57(8):1554-1560.
145. Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, & Das Gupta TK (1999) Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 85(2):375-382.
146. Bosserhoff AK, *et al.* (2003) Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest* 83(11):1583-1594.
147. Schmidt J & Bosserhoff AK (2009) Processing of MIA protein during melanoma cell migration. *Int J Cancer* 125(7):1587-1594.
148. Sil H, Sen T, & Chatterjee A (2011) Fibronectin-integrin (alpha5beta1) modulates migration and invasion of murine melanoma cell line B16F10 by involving MMP-9. *Oncol Res* 19(7):335-348.
149. Serini G, Valdembri D, & Bussolino F (2006) Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res*, United States), Vol 312, pp 651-658.
150. Donate F, *et al.* (2008) Pharmacology of the novel antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH2): observation of a U-shaped dose-response curve in several preclinical models of angiogenesis and tumor growth. *Clin Cancer Res*, United States), Vol 14, pp 2137-2144.
151. Lehmann JM, *et al.* (1987) Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res* 47(3):841-845.
152. Luca M, *et al.* (1993) Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells. *Melanoma Res* 3(1):35-41.
153. Shih IM, Elder DE, Hsu MY, & Herlyn M (1994) Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. *Am J Pathol* 145(4):837-845.
154. Braeuer RR, Zigler M, Villares GJ, Dobroff AS, & Bar-Eli M (2011) Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 21(2):83-88.
155. Zigler M, *et al.* (2011) Expression of Id-1 is regulated by MCAM/MUC18: a missing link in melanoma progression. *Cancer Res* 71(10):3494-3504.
156. Natali P, *et al.* (1990) Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res* 50(4):1271-1278.
157. Giavazzi R, *et al.* (1992) Soluble intercellular adhesion molecule 1 is released by human melanoma cells and is associated with tumor growth in nude mice. *Cancer Res* 52(9):2628-2630.
158. Becker JC, Termeer C, Schmidt RE, & Brocker EB (1993) Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction. *J Immunol* 151(12):7224-7232.
159. Ozdemir T, Zhang P, Fu C, & Dong C (2012) Fibrin serves as a divalent ligand that regulates neutrophil-mediated melanoma cells adhesion to endothelium under shear conditions. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(8):C1189-1201.
160. Ghislin S, *et al.* (2012) LFA-1 and ICAM-1 expression induced during melanoma-endothelial cell co-culture favors the transendothelial migration of melanoma cell lines in vitro. *BMC Cancer* 12:455.



161. Kageshita T, *et al.* (1995) Biochemical and immunohistochemical analysis of cathepsins B, H, L and D in human melanocytic tumours. *Arch Dermatol Res* 287(3-4):266-272.
162. Kataoka H (2009) EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci* 56(3):148-153.
163. Duffy MJ, McGowan PM, & Gallagher WM (2008) Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 214(3):283-293.
164. Santibanez JF (2013) Transforming growth factor-Beta and urokinase-type plasminogen activator: dangerous partners in tumorigenesis-implications in skin cancer. *ISRN Dermatol* 2013:597927.
165. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, & Ruiter DJ (2000) Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 115(3):337-344.
166. Crowson AN, Magro C, Miller A, & Mihm MC, Jr. (2007) The molecular basis of melanomagenesis and the metastatic phenotype. *Semin Oncol* 34(6):476-490.
167. Gould Rothberg BE, Bracken MB, & Rimm DL (2009) Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 101(7):452-474.
168. Vaisanen A, Kuvaja P, Kallioinen M, & Turpeenniemi-Hujanen T (2011) A prognostic index in skin melanoma through the combination of matrix metalloproteinase-2, Ki67, and p53. *Hum Pathol* 42(8):1103-1111.
169. Hornebeck W, *et al.* (2005) The elastin connection and melanoma progression. *Anticancer Res* 25(4):2617-2625.
170. Seiki M (2003) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett*, (Ireland), Vol 194, pp 1-11.
171. Frank A, *et al.* (2012) Regulation of MMPs during melanoma progression: from genetic to epigenetic. *Anticancer Agents Med Chem* 12(7):773-782.
172. Melnikova VO & Bar-Eli M (2009) Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 22(3):257-267.
173. Berking C, *et al.* (2001) Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res* 61(22):8306-8316.
174. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, & Opdenakker G (2000) Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96(8):2673-2681.
175. Wang Y, *et al.* (2012) Interleukin-8 secretion by ovarian cancer cells increases anchorage-independent growth, proliferation, angiogenic potential, adhesion and invasion. *Cytokine* 59(1):145-155.
176. Ntayi C, *et al.* (2004) Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol* 122(2):256-265.
177. Monboisse JC, *et al.* (2012) [Matrikines: a new anticancer therapeutic strategy]. *Biol Aujourd'hui* 206(2):111-123.
178. Gao Q, Lei T, & Ye F (2013) Therapeutic targeting of EGFR-activated metabolic pathways in glioblastoma. *Expert Opin Investig Drugs* 22(8):1023-1040.
179. Ghosh P & Chin L (2009) Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev Dermatol* 4(2):131.
180. Bardeesy N, *et al.* (2005) Role of epidermal growth factor receptor signaling in RAS-driven melanoma. *Mol Cell Biol* 25(10):4176-4188.
181. Baines AT, Xu D, & Der CJ (2011) Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem* 3(14):1787-1808.
182. Garrido MC & Bastian BC (2010) KIT as a therapeutic target in melanoma. *J Invest Dermatol* 130(1):20-27.





183. Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, & Layfield LJ (2005) Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 36(5):486-493.
184. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, & Bastian BC (2006) Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 24(26):4340-4346.
185. Pleshkan VV, Zinov'eva MV, & Sverdlov ED (2011) [Melanoma: surface markers as the first point of targeted delivery of therapeutic genes in multilevel gene therapy]. *Mol Biol (Mosk)* 45(3):416-433.
186. Luo C, *et al.* (2013) miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *J Invest Dermatol* 133(3):768-775.
187. Kenessey I (2011) [Study of motogenic signal in human melanoma cells]. *Magy Onkol* 55(1):55-58.
188. Villares GJ, *et al.* (2008) Targeting melanoma growth and metastasis with systemic delivery of liposome-incorporated protease-activated receptor-1 small interfering RNA. *Cancer Res* 68(21):9078-9086.
189. Villares GJ, Zigler M, & Bar-Eli M (2011) The emerging role of the thrombin receptor (PAR-1) in melanoma metastasis--a possible therapeutic target. *Oncotarget* 2(1-2):8-17.
190. Ye RD, *et al.* (2009) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev*, United States), Vol 61, pp 119-161.
191. Cheng TY, *et al.* (2012) Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway. *Cancer* 118(23):5757-5767.
192. Liu M, *et al.* (2012) G protein-coupled receptor FPR1 as a pharmacologic target in inflammation and human glioblastoma. *Int Immunopharmacol* 14(3):283-288.
193. Huang J, Chen K, Gong W, Dunlop NM, & Wang JM (2008) G-protein coupled chemoattractant receptors and cancer. *Front Biosci* 13:3352-3363.
194. Rondepierre F, *et al.* (2009) Proteomic studies of B16 lines: involvement of annexin A1 in melanoma dissemination. *Biochim Biophys Acta* 1794(1):61-69.
195. Chakravarti N, *et al.* (2013) Differential expression of the g-protein-coupled formyl Peptide receptor in melanoma associates with aggressive phenotype. *Am J Dermatopathol* 35(2):184-190.
196. Leiter U, *et al.* (2010) Excision guidelines and follow-up strategies in cutaneous melanoma: Facts and controversies. *Clin Dermatol* 28(3):311-315.
197. Yang AS & Chapman PB (2009) The history and future of chemotherapy for melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 23(3):583-597, x.
198. Chapman PB, *et al.* (1999) Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 17(9):2745-2751.
199. Paul MJ, *et al.* (2002) Effect of temozolomide on central nervous system relapse in patients with advanced melanoma. *Melanoma Res* 12(2):175-178.
200. Disis ML (2010) Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol* 28(29):4531-4538.
201. Speiser DE & Romero P (2010) Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity. *Semin Immunol* 22(3):144-154.
202. Lutzky J (2010) New therapeutic options in the medical management of advanced melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 29(4):249-257.
203. Fang L, Lonsdorf AS, & Hwang ST (2008) Immunotherapy for advanced melanoma. *J Invest Dermatol* 128(11):2596-2605.
204. Topalian SL, Drake CG, & Pardoll DM (2012) Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 24(2):207-212.
205. Ribas A (2012) Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med* 366(26):2517-2519.



206. Hodi FS, *et al.* (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(8):711-723.
207. Robert C, *et al.* (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 364(26):2517-2526.
208. Topalian SL, *et al.* (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366(26):2443-2454.
209. Hamid O, *et al.* (2013) Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369(2):134-144.
210. Brahmer JR, *et al.* (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366(26):2455-2465.
211. Zhang J, Yang PL, & Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9(1):28-39.
212. Bollag G, *et al.* (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467(7315):596-599.
213. Falchook GS, *et al.* (2012) Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 379(9829):1893-1901.
214. Chapman PB, *et al.* (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364(26):2507-2516.
215. Heidorn SJ, *et al.* (2010) Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 140(2):209-221.
216. Hatzivassiliou G, *et al.* (2010) RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464(7287):431-435.
217. Zimmer L, *et al.* (2012) Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition. *J Clin Oncol* 30(19):2375-2383.
218. Callahan MK, *et al.* (2012) Progression of RAS-mutant leukemia during RAF inhibitor treatment. *N Engl J Med* 367(24):2316-2321.
219. Shi H, *et al.* (2012) Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun* 3:724.
220. Poulikakos PI, *et al.* (2011) RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480(7377):387-390.
221. Nazarian R, *et al.* (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468(7326):973-977.
222. Wagle N, *et al.* (2011) Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 29(22):3085-3096.
223. Deng W, *et al.* (2012) Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res* 25(2):248-258.
224. Fedorenko IV, Paraiso KH, & Smalley KS (2011) Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol* 82(3):201-209.
225. Wilmott JS, *et al.* (2012) Intratumoral molecular heterogeneity in a BRAF-mutant, BRAF inhibitor-resistant melanoma: a case illustrating the challenges for personalized medicine. *Mol Cancer Ther* 11(12):2704-2708.
226. Das Thakur M, *et al.* (2013) Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* 494(7436):251-255.
227. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, & Hansson J (2008) Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 1(4):395-405.
228. Falchook GS, *et al.* (2012) Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 13(8):782-789.



229. Kim KB, *et al.* (2013) Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol* 31(4):482-489.
230. Ascierto PA, *et al.* (2013) MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 14(3):249-256.
231. Guo J, *et al.* (2011) Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* 29(21):2904-2909.
232. Cho JH, Kim KM, Kwon M, Kim JH, & Lee J (2012) Nilotinib in patients with metastatic melanoma harboring KIT gene aberration. *Invest New Drugs* 30(5):2008-2014.
233. Todd JR, Becker TM, Kefford RF, & Rizos H (2013) Secondary c-Kit mutations confer acquired resistance to RTK inhibitors in c-Kit mutant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 26(4):518-526.
234. Carvajal RD, *et al.* (2011) KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *Jama* 305(22):2327-2334.
235. Menzies AM & Long GV (2013) Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond. *Eur J Cancer* 49(15):3229-3241.
236. Flaherty KT, *et al.* (2012) Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 367(18):1694-1703.
237. Konopka-Postupolska D, Clark G, & Hofmann A (2011) Structure, function and membrane interactions of plant annexins: an update. *Plant Sci* 181(3):230-241.
238. Morgan RO, Martin-Almedina S, Iglesias JM, Gonzalez-Florez MI, & Fernandez MP (2004) Evolutionary perspective on annexin calcium-binding domains. *Biochim Biophys Acta* 1742(1-3):133-140.
239. Hofmann A, *et al.* (2010) Parasite annexins--new molecules with potential for drug and vaccine development. *Bioessays* 32(11):967-976.
240. Morgan RO, Martin-Almedina S, Garcia M, Jhoncon-Kooyip J, & Fernandez MP (2006) Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints. *Biochim Biophys Acta* 1763(11):1238-1249.
241. Gerke V & Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82(2):331-371.
242. Moss SE & Morgan RO (2004) The annexins. *Genome Biol* 5(4):219.
243. John CD, *et al.* (2004) Annexin 1 and the regulation of endocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 15(3):103-109.
244. Hall SC, *et al.* (1993) Mass spectrometric and Edman sequencing of lipocortin I isolated by two-dimensional SDS/PAGE of human melanoma lysates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5):1927-1931.
245. Raynal P & Pollard HB (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197(1):63-93.
246. Rosengarth A, Gerke V, & Luecke H (2001) X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. *J Mol Biol* 306(3):489-498.
247. Glenney JR, Jr. & Tack BF (1985) Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(23):7884-7888.
248. Johnsson N, Nguyen Van P, Soling HD, & Weber K (1986) Functionally distinct serine phosphorylation sites of p36, the cellular substrate of retroviral protein kinase; differential inhibition of reassociation with p11. *Embo J* 5(13):3455-3460.
249. Rosengarth A, Wintergalen A, Galla HJ, Hinz HJ, & Gerke V (1998) Ca<sup>2+</sup>-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers. *FEBS Lett* 438(3):279-284.



250. Bitto E & Cho W (1999) Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry* 38(42):14094-14100.
251. Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, & Libert C (2013) New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 154(3):993-1007.
252. Castro-Caldas M (2006) [Annexin-1: 2nd messenger of the anti-inflammatory actions of glucocorticoids]. *Acta Reumatol Port* 31(4):293-302.
253. Alessandri AL, *et al.* (2013) Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther* 139(2):189-212.
254. Ley K (1996) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* 32(4):733-742.
255. Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76(2):301-314.
256. Perretti M & D'Acquisto F (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 9(1):62-70.
257. Philip JG, Flower RJ, & Buckingham JC (1998) Blockade of the classical pathway of protein secretion does not affect the cellular exportation of lipocortin 1. *Regul Pept* 73(2):133-139.
258. Walther A, Riehemann K, & Gerke V (2000) A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol Cell* 5(5):831-840.
259. Strausbaugh HJ & Rosen SD (2001) A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from myeloid cells. *J Immunol* 166(10):6294-6300.
260. Solito E, Romero IA, Marullo S, Russo-Marie F, & Weksler BB (2000) Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. *J Immunol* 165(3):1573-1581.
261. Euzger HS, Flower RJ, Goulding NJ, & Perretti M (1999) Differential modulation of annexin I binding sites on monocytes and neutrophils. *Mediators Inflamm* 8(1):53-62.
262. Solito E, *et al.* (2003) A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *Faseb J* 17(11):1544-1546.
263. Blume KE, *et al.* (2012) Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic "find-me" signal. *J Immunol* 188(1):135-145.
264. Williams SL, *et al.* (2010)
- ) A proinflammatory role for proteolytically cleaved annexin A1 in neutrophil transendothelial migration. *J Immunol* 185(5):3057-3063.
265. Omer S, Meredith D, Morris JF, & Christian HC (2006) Evidence for the role of adenosine 5'-triphosphate-binding cassette (ABC)-A1 in the externalization of annexin 1 from pituitary folliculostellate cells and ABCA1-transfected cell models. *Endocrinology* 147(7):3219-3227.
266. Solito E, *et al.* (2006) Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *Faseb J* 20(9):1498-1500.
267. Perretti M, *et al.* (2000) Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. *Cell Biol Int* 24(3):163-174.
268. Woloszynek JC, Hu Y, & Pham CT (2012) Cathepsin G-regulated release of formyl peptide receptor agonists modulate neutrophil effector functions. *J Biol Chem* 287(41):34101-34109.
269. Scannell M, *et al.* (2007) Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 178(7):4595-4605.
270. Vong L, *et al.* (2007) Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3. *J Biol Chem* 282(41):29998-30004.





271. Pederzoli-Ribeil M, *et al.* (2010) Design and characterization of a cleavage-resistant Annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature. *Blood* 116(20):4288-4296.
272. Christmas P, Callaway J, Fallon J, Jones J, & Haigler HT (1991) Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. *J Biol Chem* 266(4):2499-2507.
273. Jahn R, Lang T, & Sudhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112(4):519-533.
274. Donnelly SR & Moss SE (1997) Annexins in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci* 53(6):533-538.
275. Sakaguchi M, *et al.* (2007) Truncation of annexin A1 is a regulatory lever for linking epidermal growth factor signaling with cytosolic phospholipase A2 in normal and malignant squamous epithelial cells. *J Biol Chem* 282(49):35679-35686.
276. Ang EZ, Nguyen HT, Sim HL, Putti TC, & Lim LH (2009) Annexin-1 regulates growth arrest induced by high levels of estrogen in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7(2):266-274.
277. Lim LH & Pervaiz S (2007) Annexin 1: the new face of an old molecule. *Faseb J* 21(4):968-975.
278. McKanna JA (1995) Lipocortin 1 in apoptosis: mammary regression. *Anat Rec* 242(1):1-10.
279. Sakamoto T, Repasky WT, Uchida K, Hirata A, & Hirata F (1996) Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H2O2-treated rat thymocytes by lipocortin I. *Biochem Biophys Res Commun* 220(3):643-647.
280. Solito E, de Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, & Perretti M (2001) Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol* 133(2):217-228.
281. Wu YL, Jiang XR, Lillington DM, Newland AC, & Kelsey SM (2000) Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance. *Br J Haematol* 111(3):807-816.
282. Petrella A, *et al.* (2005) Induction of annexin-1 during TRAIL-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell Death Differ* 12(10):1358-1360.
283. Pin AL, *et al.* (2012) Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression. *J Biol Chem* 287(36):30541-30551.
284. Bizzarro V, *et al.* (2012) Annexin A1 N-terminal derived peptide Ac2-26 stimulates fibroblast migration in high glucose conditions. *PLoS One* 7(9):e45639.
285. Bizzarro V, Belvedere R, Dal Piaz F, Parente L, & Petrella A (2012) Annexin A1 induces skeletal muscle cell migration acting through formyl peptide receptors. *PLoS One* 7(10):e48246.
286. Mussunoor S & Murray GI (2008) The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol* 216(2):131-140.
287. Deng S, *et al.* (2013) Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically. *Oncol Lett* 5(1):107-112.
288. Chuthapisith S, *et al.* (2009) Annexins in human breast cancer: Possible predictors of pathological response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer* 45(7):1274-1281.
289. Brachvogel B, *et al.* (2003) Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* 23(8):2907-2913.
290. Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer C, & Murray GI (2008) Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer* 98(2):426-433.
291. Xia SH, *et al.* (2002) Three isoforms of annexin I are preferentially expressed in normal esophageal epithelia but down-regulated in esophageal squamous cell carcinomas. *Oncogene* 21(43):6641-6648.
292. Garcia Pedrero JM, *et al.* (2004) Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol* 164(1):73-79.
293. Bai XF, *et al.* (2004) Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 10(10):1466-1470.



294. Su N, *et al.* (2010) Increased expression of annexin A1 is correlated with K-ras mutation in colorectal cancer. *Tohoku J Exp Med* 222(4):243-250.
295. Sheng KH, Yao YC, Chuang SS, Wu H, & Wu TF (2006) Search for the tumor-related proteins of transition cell carcinoma in Taiwan by proteomic analysis. *Proteomics* 6(3):1058-1065.
296. Biaoxue R, *et al.* (2012) Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 31:70.
297. Yang Y, *et al.* (2011) Annexin 1 released by necrotic human glioblastoma cells stimulates tumor cell growth through the formyl peptide receptor 1. *Am J Pathol* 179(3):1504-1512.
298. Ahn SH, Sawada H, Ro JY, & Nicolson GL (1997) Differential expression of annexin I in human mammary ductal epithelial cells in normal and benign and malignant breast tissues. *Clin Exp Metastasis* 15(2):151-156.
299. Shen D, *et al.* (2006) Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis. *Hum Pathol* 37(12):1583-1591.
300. Bist P, *et al.* (2011) Annexin-1 interacts with NEMO and RIP1 to constitutively activate IKK complex and NF-kappaB: implication in breast cancer metastasis. *Oncogene* 30(28):3174-3185.
301. Kang H, Ko J, & Jang SW (2012) The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 423(1):188-194.
302. de Graauw M, *et al.* (2010) Annexin A1 regulates TGF-beta signaling and promotes metastasis formation of basal-like breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(14):6340-6345.
303. Lokman NA, Ween MP, Oehler MK, & Ricciardelli C (2011) The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenviron* 4(2):199-208.
304. Jeon YR, *et al.* (2013) Identification of annexin II as a novel secretory biomarker for breast cancer. *Proteomics*.
305. Sakwe AM, Koumangoye R, Guillory B, & Ochieng J (2011) Annexin A6 contributes to the invasiveness of breast carcinoma cells by influencing the organization and localization of functional focal adhesions. *Exp Cell Res* 317(6):823-837.
306. Moss SE & Crumpton MJ (1990) Alternative splicing gives rise to two forms of the p68 Ca2(+)-binding protein. *FEBS Lett* 261(2):299-302.
307. Babbitt BA, *et al.* (2006) Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. *J Biol Chem* 281(28):19588-19599.
308. Haffner C & Haass C (2004) The biochemical and genetic odyssey to the function of a nicastrin-like protein. *Neurodegener Dis* 1(4-5):192-195.
309. Lee B, Mukhi N, & Liu D (2012) Current management and novel agents for malignant melanoma. *J Hematol Oncol* 5:3.
310. Finn L, Markovic SN, & Joseph RW (2012) Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med* 10:23.
311. Elder DE (2011) Thin melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 135(3):342-346.
312. Yi M & Schnitzer JE (2009) Impaired tumor growth, metastasis, angiogenesis and wound healing in annexin A1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(42):17886-17891.
313. Naba A, *et al.* (2012) The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics* 11(4):M111014647.
314. Yang YH, Morand E, & Leech M (2013) Annexin A1: potential for glucocorticoid sparing in RA. *Nat Rev Rheumatol* 9(10):595-603.
315. Hongsrichan N, *et al.* (2013) Annexin A1: A new immunohistological marker of cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 19(16):2456-2465.
316. Werle M, Schmal U, Hanna K, & Kreuzer J (2002) MCP-1 induces activation of MAP-kinases ERK, JNK and p38 MAPK in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 56(2):284-292.



317. Chiang N, *et al.* (2006) The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev* 58(3):463-487.
318. Serhan CN, Chiang N, & Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8(5):349-361.
319. Dufton N, *et al.* (2011) Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *J Immunol* 184(5):2611-2619.
320. Soehnlein O, *et al.* (2008) Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 112(4):1461-1471.
321. He R, Sang H, & Ye RD (2003) Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood* 101(4):1572-1581.
322. El Kebir D, *et al.* (2007) Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils: a novel mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol* 179(1):616-622.
323. Cooray SN, *et al.* (2013) Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
324. Darnell JE, Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277(5332):1630-1635.
325. Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, & Nishigori C (2012) Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol* 132(7):1877-1885.
326. Wen Z, Zhong Z, & Darnell JE, Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82(2):241-250.
327. Peinado H, *et al.* (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18(6):883-891.
328. Aalberts M, *et al.* (2012) Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. *Biol Reprod* 86(3):82.
329. Tsai WH, *et al.* (2012) Annexin A1 mediates the anti-inflammatory effects during the granulocytic differentiation process in all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemic cells. *J Cell Physiol* 227(11):3661-3669.
330. Haass C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J* 23(3):483-488.
331. Hardy J & Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297(5580):353-356.
332. Sisodia SS & St George-Hyslop PH (2002) gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3(4):281-290.
333. Dalli J, *et al.* (2013) Proresolving and tissue-protective actions of annexin A1-based cleavage-resistant peptides are mediated by formyl peptide receptor 2/lipoxin A4 receptor. *J Immunol*, United States), Vol 190, pp 6478-6487.

